

(1)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-083969
(43)Date of publication of application : 19.03.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/531
C07D339/02
C07D495/04
C07H 15/04
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-280672

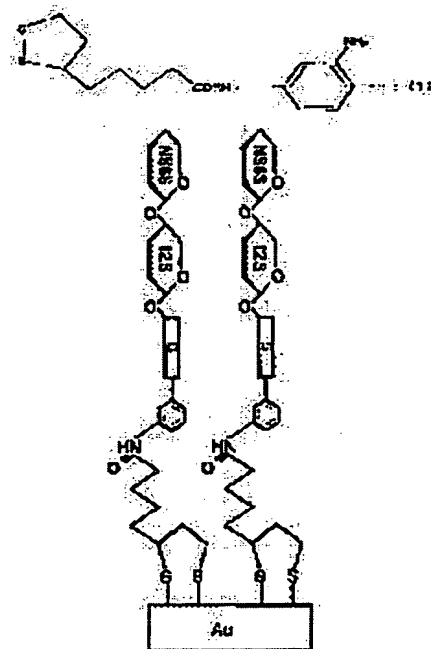
(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 14.09.2001

(72)Inventor : SUMIDA YASUO
KUSUMOTO SHOICHI
ARANO AKIO**(54) LINKER COMPOUND, LIGAND, OLIGOSACCHARIDE CHAIN FIXING METHOD AND SUPPORT FOR ANALYZING PROTEIN****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a linker compound capable of simply fixing an oligosaccharide chain to the surface of a support for analyzing protein in one stage using an oligosaccharide of every kind isolated from the natural world and obtained by refining as it is and capable of obtaining the support for analyzing protein reduced in the effect due to non-specific interaction based on the hydrophobic interaction with protein analyzed using the support for analyzing protein and capable of continuously and quantitatively evaluating the coupling interaction with protein of every kind.

SOLUTION: The linker compound has a structure represented by formula (1) and can fix the oligosaccharide chain in a ligand to the surface of the support for analyzing protein by an S-Au bond in one stage.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

24.07.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

A. Relevance of the Above-identified Document

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

2. A linker compound represented by general formula

Nc1ccc(cc1)C(=O)N2CCN(CCCC(=O)N3C(=O)NC4C(S3)C=C4)CC2C(=O)c5ccc(N)cc5

... (2)

5. A linker compound represented by general formula

[illegible]

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEMS]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Nc1ccc(cc1)C(=O)N2CCN(C(=O)CCCC[C@@H]3c4cc[nH]c4=O)CC2N3C(=O)c5ccc(N)cc5

... (2)

[illegible]

[DESCRIPTION OF THE EMBODIMENTS]

[First Embodiment]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

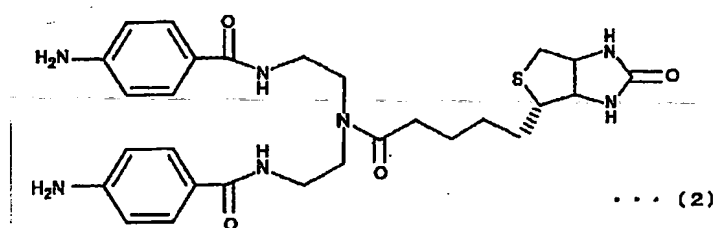
[0115] Moreover, in order to evaluate a biological activity of an oligosaccharide, the inventors diligently studied to effectively assemble oligosaccharides and introduce many oligosaccharides in a single step onto a surface of a protein-analyzing supporter. As a result, the inventors have found that oligosaccharides can be assembled and immobilized as follows. First, as shown in Fig. 6, a linker compound (biotin linker) having a multivalent aromatic amine moiety and a biotin moiety is used to assemble oligosaccharic chains, and a biotin-streptoavidin (or avidin) bond is used to immobilize the oligosaccharic chains on a surface of a protein-analyzing supporter such as an SPR sensor chip or an affinity chromatography carrier, thereby introducing the oligosaccharides in a single step onto the surface of the protein-analyzing supporter. Note in Fig. 6 and other drawings below that St represents streptoavidin (or avidin), and Bi represents a biotin.

[0116] In the following, as another linker compound according to the present invention, a biotin linker will be described which includes a linker compound and a biotin introduced therein, instead of a linker compound having a moiety with a S-S bond within the molecule. Further, a ligand using the biotin linker, a method for immobilizing oligosaccharide chains using the ligand, and a protein-analyzing supporter having the ligand immobilized

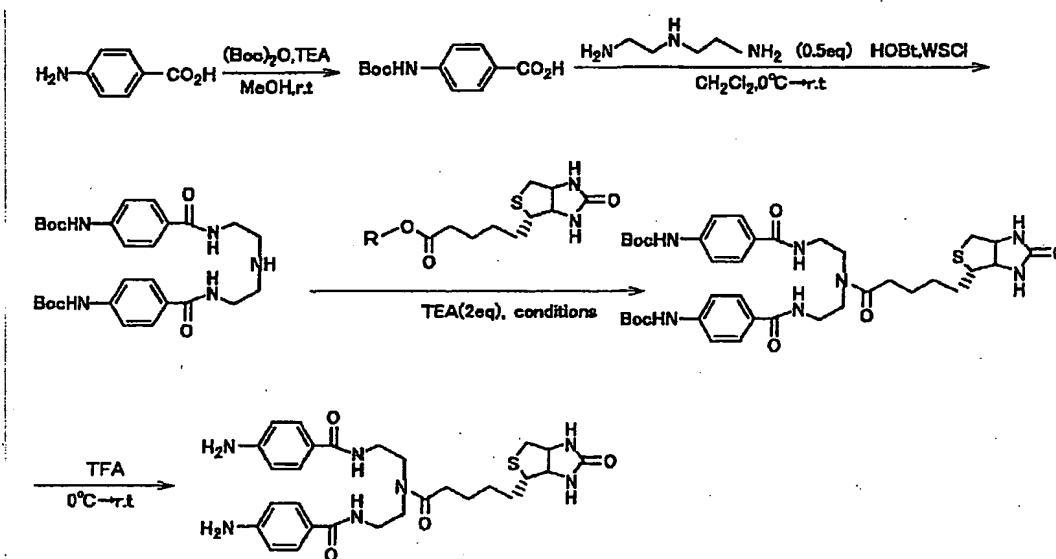
THIS PAGE BLANK (USPTO)

thereon will be described.

[0117] Another linker compound according to the present invention is a versatile linker which has a reactive site capable of bonding a biotin to a plurality of oligosaccharides, and has a structure represented by general formula (2).



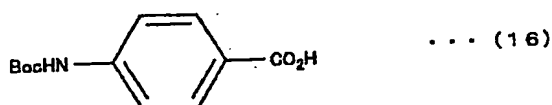
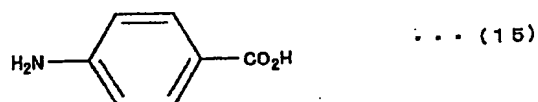
[0120] The linker compound represented by general formula (2) can be easily obtained for example by a reaction below.



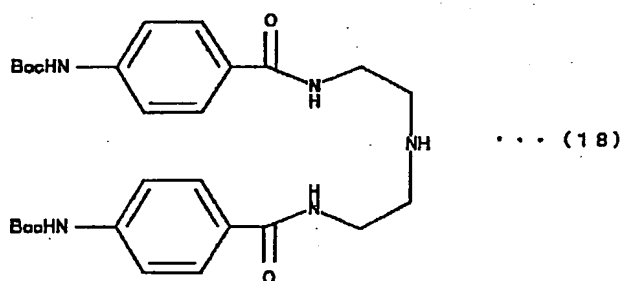
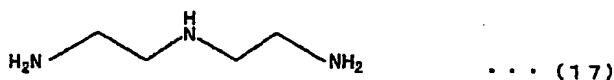
[0123] First, according to the above-mentioned reaction formula, p-aminobenzoic acid represented by following general formula (15) is allowed to react with (Boc)₂O at room temperature in the presence of MeOH and

THIS PAGE BLANK (USPTO)

triethylamine (TEA), and an amino group of p-aminobenzoic acid represented by general formula (15) is protected by a Boc group (turned into Boc) to obtain a compound represented by following general formula (16).



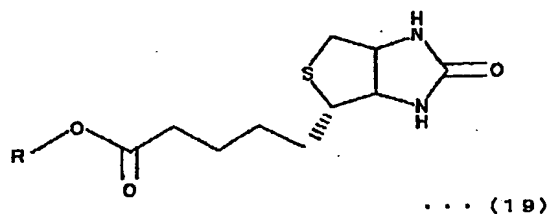
[0128] Then, at a reaction temperature raised from 0°C to room temperature, the compound represented by general formula (16) is condensed with diethylenetriamine (0.5 equiv.) represented by following general formula (17) in CH₂Cl₂ in the presence of HOBT, EDC. HCl to obtain a compound represented by following general formula (18).

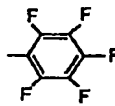
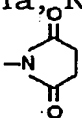


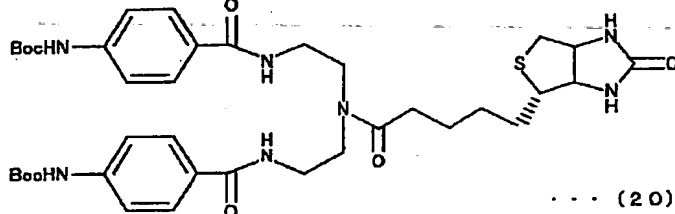
[0133] Then, the compound represented by general formula (18) is dissolved in N, N-dimethylformamide (DMF), and the resulting solution is allowed to react with a biotin active ester compound represented by following general formula (19) in the presence of TEA (2 equiv.) to obtain a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

compound represented by following general formula (20).



(In the formula, R represents a group (Pfp)  or a group (Su) )



[0138] Then, at a reaction temperature raised from 0°C to room temperature, the Boc group of the compound represented by general formula (20), i.e., a protecting group of an amino group is removed (deprotected) with trifluoroacetic acid (TFA). In this way, a biotin linker, represented by general formula (2), for assembling two units of sugar chains was obtained as a linker compound according to the present invention.

[0139] In the present embodiment, an amino group of p-aminobenzoic acid represented by general formula (15) was protected (turned into Boc) to obtain a compound represented by general formula (16) at the yield of 75%. Then, the compound represented by general formula (16) was allowed to react with diethylenetriamine (0.5 equiv.) represented by general formula (17) under the foregoing

THIS PAGE BLANK (USPTO)

conditions to prepare a compound represented by general formula (18) at the yield of 93%. Thereafter, the compound represented by general formula (18) was allowed to react with a biotin active ester compound represented by general formula (19) under the foregoing conditions to obtain a compound (ESI-MS (positive) $m/z=524.4$ $[M+H]^+$) represented by general formula (20). The compound represented by general formula (20) was obtained at the following yields (see Table 2) under varying reaction conditions (solvents and reaction temperatures) of the biotin active ester compound and the reaction formula, as indicated by "conditions."

[0140]

[Table 2]

Example Reaction	R	Conditions	Yield
1	Su	DMF, r. t→50°C	45%
2	Pfp	DMF, r. t	63%

[0141] As shown in Table 2, the system using a pentafluorophenyl group (Pfp) as a biotin active ester made it possible to obtain the target compound represented by general formula (18) at the highest yield.

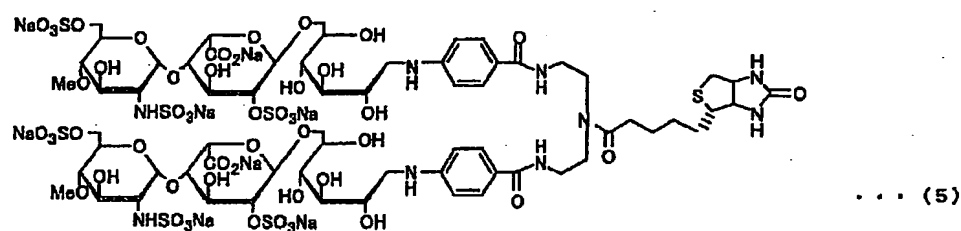
[0142] Subsequently, the Boc group of the compound represented by general formula (18) is deprotected with TFA to obtain the biotin linker, i.e., the linker compound represented by general formula (2) was obtained at the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

yield of 91%.

[0143] Subsequently, the linker compound was used to assemble oligosaccharic chains. Used as sugar chains to be assembled were sulfated partial disaccharides in heparin, i.e., a partial disaccharide structure (GlcNS6S-IdoA2S) which interacts with a coagulant von Willebrand's factor peptide (vWF peptide).

[0144] That is, a ligand according to the present invention using the biotin linker has a structure represented by following general formula (5) and has a structure including the linker compound represented by general formula (2) with sulfated partial disaccharides (GlcNS6S-IdoA2S) in heparin introduced therein.

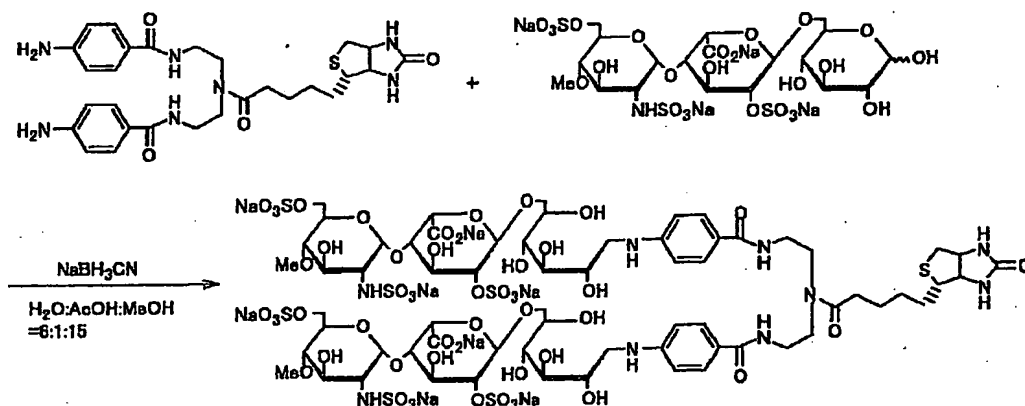


[0147] Thus, the ligand represented by general formula (5) has a structural unit derived from the linker compound represented by general formula (2), and can utilize a strong biotin-streptoavidin (or avidin) affinity to immobilize the sulfated partial disaccharides (GlcNS6S-IdoA2S), serving as oligosaccharide chains, on a surface of a protein analyzing supporter through a biotin-streptoavidin (or avidin) bond.

[0148] The ligand represented by general formula (5),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

as shown in the following reaction formula, was prepared as follows. First, a trisaccharide including the sulfated partial disaccharide, i.e., a trisaccharide, represented by general formula (13), which includes a glucose unit introduced into a reducing end of a partial structure disaccharide in heparin was dissolved in a mixed solvent of H₂O, AcOH, and MeOH, and by an optimum reductive amination reaction, the trisaccharide was introduced into the biotin linker, serving as a versatile linker compound, which is represented by general formula (2), in the presence of NaBH₃CN.



[0151] Table 3 shows conditions for the reaction of the linker compound represented by general formula (2) with a trisaccharide.

[0152]

[Table 3]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Example Reaction	Solvent and Molar Ratio	Yield
1	H ₂ O:AcOH=1:1	No reaction
2	H ₂ O:AcOH:MeOH=15:1:6	47%
3	H ₂ O:AcOH:MeOH=6:1:15	60%

[0153] As can be seen from Table 3, the linker compound represented by general formula (2) reacts with the trisaccharide in a solvent system of acetic acid, water, and methanol in the presence of NaBH₃CN. For example, the linker compound represented by general formula (2) is allowed to react with the trisaccharide under the conditions shown in Reaction Example 3 to obtain a target ligand according to the present invention having two units of sugar chains assembled therein, i.e., a versatile ligand (oligosaccharide-ligand; ESI-MS (negative) m/z=523.8 [M-7Na+3H]⁴⁻), containing two units of heparin partial disaccharide structures, which is represented by general formula (5).

[0154] Then, the oligosaccharide-ligand was used to confirm an interaction between the oligosaccharide-ligand and the synthetic vWF peptide, using SPR. First, by the strong biotin-streptoavidin affinity, the compound represented by general formula (5) was arranged on a surface of an SPR sensor chip having streptoavidin immobilized thereon, and the interaction of the compound with the heparin-binding model peptide was examined, and usefulness of the compound was evaluated.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[0155] Referring to Figs. 7(a) to 7(d), the following will describe a procedure by which the oligosaccharide-ligand is immobilized on the SPR sensor chip.

[0156] According to the oligosaccharide-ligand of the present invention, a solution containing the oligosaccharide-ligand is brought into contact with an SPR sensor chip having streptoavidin immobilized thereon (streptoavidin-immobilized chip). In this way, the oligosaccharide chain contained in the oligosaccharide-ligand, i.e., the oligosaccharide chain incorporated in the biotin linker can be immobilized on a surface of the SPR sensor chip in a single step.

[0157] The streptoavidin-immobilized chip is produced as follows. First, as shown in Fig. 7(a), a surface of a glass substrate is coated with gold to form an SPR sensor chip. Next, as shown in Fig. 7(b), 4,4-dithiodibutyric acid represented by following general formula (21) is immobilized on the surface of the SPR sensor chip by Au-S bonding. Then, as shown in Fig. 7(c), the 4,4-dithiodibutyric acid so immobilized is allowed to react with N-hydroxysuccinimide in the presence of water-soluble carbodiimide and activated. Finally, as shown in Fig. 7(d), an end amino group of the streptoavidin is condensed, i.e., streptoavidin is immobilized.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



[0160] Fig. 8 shows an example of a result of an SPR sensorgram, in the case where streptoavidin was immobilized on an SPR sensor chip. The horizontal axis represents time during which a running buffer was flown, and the vertical axis represents resonant angle change (RU: response unit).

[0161] Further, in Fig. 8, the arrow X represents an injection of a streptoavidin solution, and the arrow Y represents an automatic switching to a running buffer. Note that PBS at pH 7.4 was used as the running buffer, a flow rate of which was 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Further, used as a surface plasmon resonance device was the surface plasmon resonance device "SPR670" manufactured by Nippon Laser Electronics Co., Ltd. Then, streptoavidin which had not been involved in the binding was washed away with the running buffer, and active ester remaining on the chip was subjected to a capping (inactivated) with 1M aminoethanol. The amount of streptoavidin finally immobilized was quantified by a change in the resonant angle caused by the capping with aminoethanol, with respect to the baseline before the injection of streptoavidin. The immobilization quantity of streptoavidin in the sensorgram was 2930 RU.

[0162] The oligosaccharide-ligand according to the present invention can be immobilized on the thus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

produced streptoavidin-immobilized chip by the strong biotin-streptoavidin affinity. With the oligosaccharide-ligand, an aggregate of oligosaccharide chains can be immobilized in a single step on a surface of the sensor chip when a solution containing the oligosaccharide-ligand is brought into contact with an SPR chip having streptoavidin immobilized thereon.

[0163] A specific example of the solution containing the oligosaccharide-ligand is a PBS solution of the oligosaccharide-ligand.

[0164] According to the present embodiment, a sensor chip having a heparin partial disaccharide structure on a surface thereof was produced as follows. First, the sensor chip having streptoavidin immobilized thereon was immersed in a solution containing the oligosaccharide-ligand, e.g., a PBS solution of the oligosaccharide-ligand. Alternatively, as described later, the solution containing the oligosaccharide-ligand was injected into the sensor chip having streptoavidin immobilized thereon. Then, the oligosaccharide-ligand was immobilized on the sensor chip through a biotin-streptoavidin bond using a known biotin-avidin specific binding interaction.

[0165] Next, the sensor chip was used to measure the binding constant K_D of the sensor chip for a vWF peptide. Fig. 9(a) shows an SPR sensor chip having

THIS PAGE BLANK (USPTO)

streptoavidin immobilized thereon. A measurement of the binding constant of the sensor chip for the vWF peptide was conducted as follows. First, as shown in Fig. 9(a), oligosaccharide-ligand-containing PBS solutions of various concentrations were injected into the sensor chip. Next, as shown in Fig. 9(b), the oligosaccharide-ligand was immobilized. Then, as shown in Fig. 9(c), vWF peptides of various concentrations were injected. An example of a sensorgram thus obtained is shown in Fig. 10.

[0166] Fig. 10 shows an example of a result of the SPR sensorgram in the case where vWF peptides of various concentrations were injected into the sensor chip having the oligosaccharide-ligand immobilized thereon. The horizontal axis represents time during which a running buffer was flown, and the vertical axis represents resonant angle change (RU).

[0167] Further, in Fig. 10, the upward arrow (\uparrow) represents an injection of the oligosaccharide-ligand, and the downward arrow (\downarrow) represents an injection of the running buffer for washing away the oligosaccharide-ligand which had not been involved in the binding. The oligosaccharide-ligand, whose concentration was continuously varied from 1.39 μM to 2.22 μM , was added to the sensor chip. Note that, a PBS at pH 7.4 was used as the running buffer, a flow rate of which was 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Further, used as a surface plasmon resonance

THIS PAGE BLANK (USPTO)

device was the surface plasmon resonance device "SPR670" manufactured by Nippon Laser Electronics Co., Ltd. The amount of immobilized oligosaccharide-ligand is equivalent to a change in resonance angle (RU) with respect to the baseline, when the resonance angle becomes constant with an excess oligosaccharide-ligand washed away. The immobilization quantity of the oligosaccharide-ligand in the sensorgram was 140 RU.

[0168] Subsequently, a vWF peptide was injected into and bonded to the sensor chip having the oligosaccharide-ligand immobilized thereon. Then, the oligosaccharide-ligand was dissociated from the vWF peptide, and a resonant angle change (RU) was observed. The vWF peptide was added to the sensor chip by continuously varying its concentration from 0.5 μ M to 1.0 μ M. The binding constant K_D was calculated by using the binding velocity and the dissociation velocity. The binding velocity was calculated from a positive resonant angle change due to the binding of the oligosaccharide-ligand with the vWF peptide, and the dissociation velocity was calculated from a negative resonant angle change due to the dissociation of the oligosaccharide-ligand from the vWF peptide.

[0169] The binding constant K_D calculated from the measurement had a value ($K_D=280$ nM) almost equal to the value (M. Sobel et al. J. Biol. Chem. (1992), vol. 267, p.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8857; $K_D=370\pm100$ nM) calculated by Sobel et al. with a radiolabeling method.

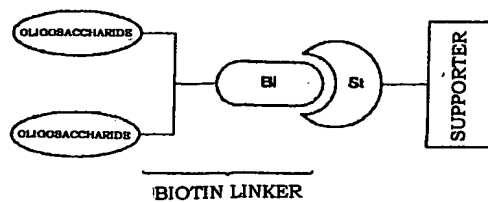
[0170] As described above, in the present embodiment, a novel biotin linker for assembling sugar chains was provided. Further, the sugar chains were actually assembled by using the biotin linker. Moreover, the interaction of the assembled sugar chains with a protein was confirmed with SPR, finding that the biotin linker is applicable to SPR.

[0171] Thus, the biotin linker has a biotin introduced within the molecule, so that the biotin linker can immobilize oligosaccharide chains on a chip having streptoavidin immobilized thereon by a known method, or on an affinity chromatography carrier, through a biotin-streptoavidin bond using the strong specific biotin-streptoavidin interaction.

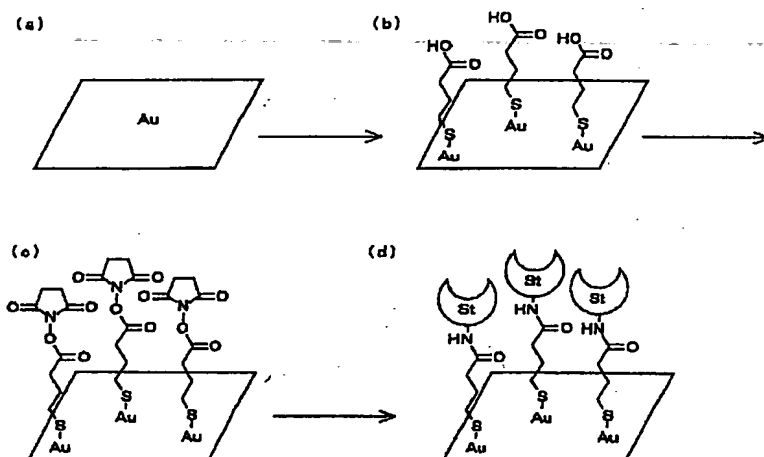
[0172] As a result, by using the biotin linker, an oligosaccharide chain having a reducing end can easily be immobilized on a surface of a protein-analyzing supporter. Further, the biotin linker has made it possible to directly immobilize oligosaccharides on a surface of a protein-analyzing supporter after the oligosaccharides are isolated and purified from nature, a feat conventionally unachievable.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

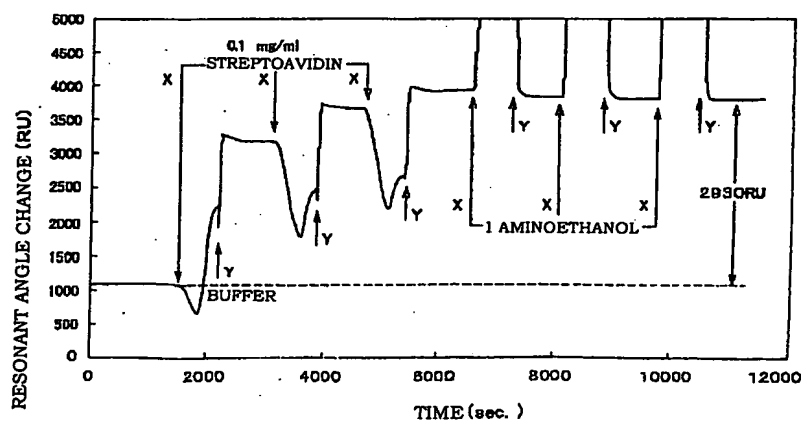
[FIG. 6]



[FIG. 7]

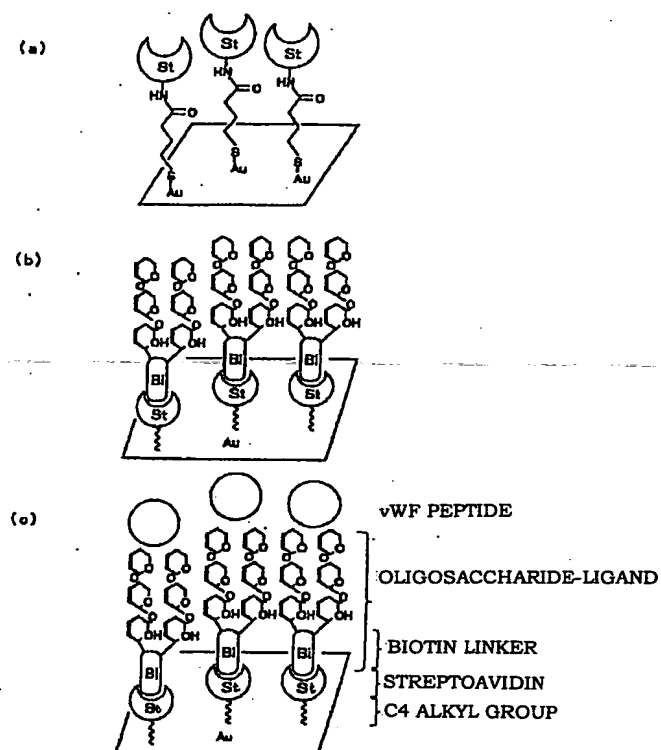


[FIG. 8]

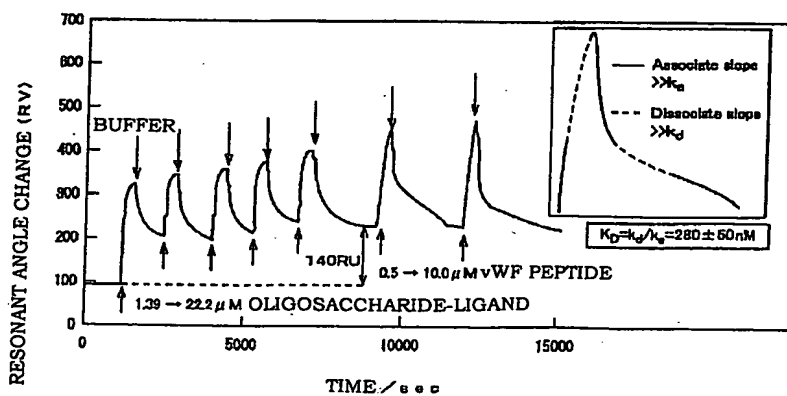


THIS PAGE BLANK (USPTO)

[FIG. 9]



[FIG. 10]



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-83969

(P2003-83969A)

(43) 公開日 平成15年3月19日 (2003.3.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/531		G 0 1 N 33/531	B 4 C 0 5 7
C 0 7 D 339/02		C 0 7 D 339/02	4 C 0 7 1
495/04	1 0 3	495/04	1 0 3
C 0 7 H 15/04		C 0 7 H 15/04	E
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-280672(P2001-280672)

(22) 出願日 平成13年9月14日 (2001.9.14)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月15日
 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第79春季年会
 2001年 講演予稿集 I I」に発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 隅田 泰生

兵庫県西宮市甲子園三保町1-8-502

(72) 発明者 楠本 正一

大阪府箕面市半町3-5, C-114

(72) 発明者 荒野 明男

大阪府箕面市瀬川2-18-8-201

(74) 代理人 100080034

弁理士 原 謙三

最終頁に続く

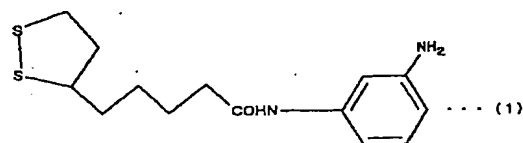
(54) 【発明の名称】 リンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体

(57) 【要約】

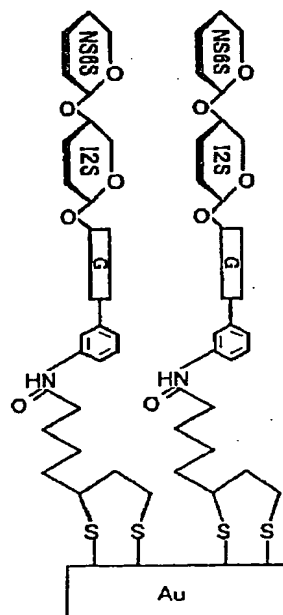
【課題】 自然界から単離、精製して得られる種々のオリゴ糖をそのまま用いて一段階で蛋白質分析用の支持体表面にオリゴ糖鎖を簡便に固定化することができると共に、蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用による影響が低減され、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価できる蛋白質分析用の支持体を得ることができるリンカー化合物を提供する。

【解決手段】 リンカー化合物は、一般式(1)

【化38】

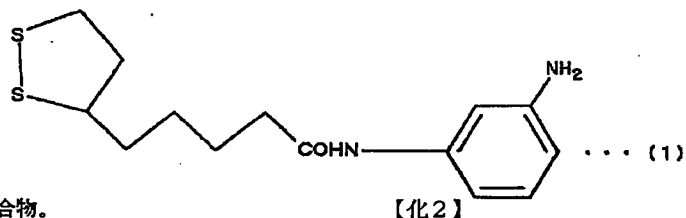


で表される構造を有している。上記リンカー化合物は、S-Au結合によりリガンド中のオリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体表面に一段階で固定できる。



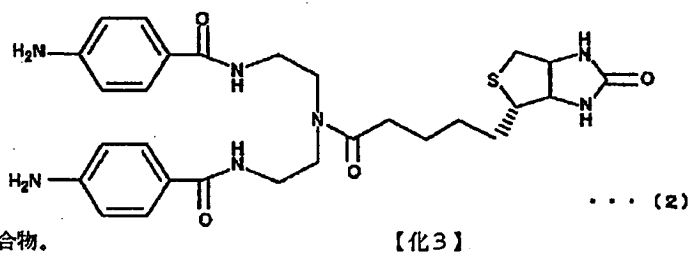
【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式(1)



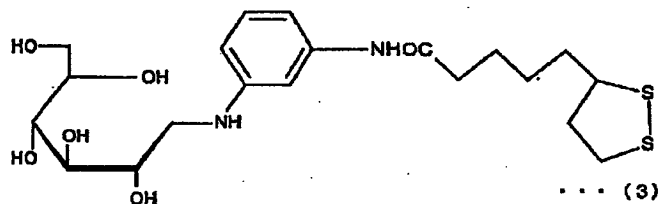
で表されるリンカー化合物。

【請求項2】一般式(2)



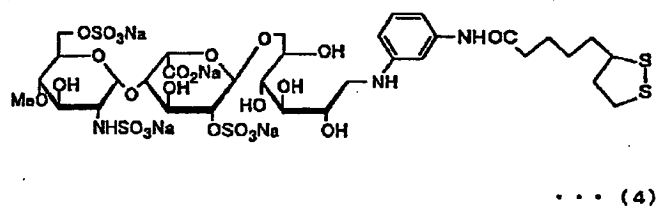
で表されるリンカー化合物。

【請求項3】一般式(3)



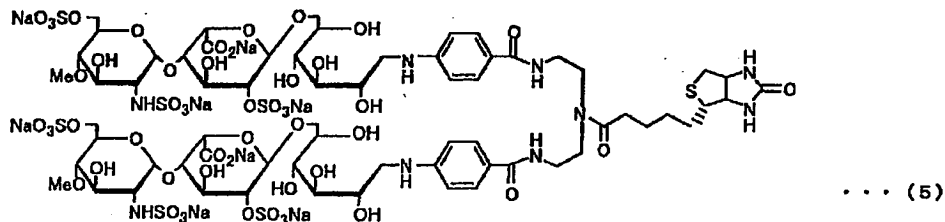
で表されるリガンド。

【請求項4】一般式(4)



で表されるリガンド。

【請求項5】一般式(5)



で表されるリガンド。

【請求項6】オリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体の表面

に固定化するオリゴ糖鎖の固定化方法であって、

請求項3または4記載のリガンドを含む溶液と、表面に

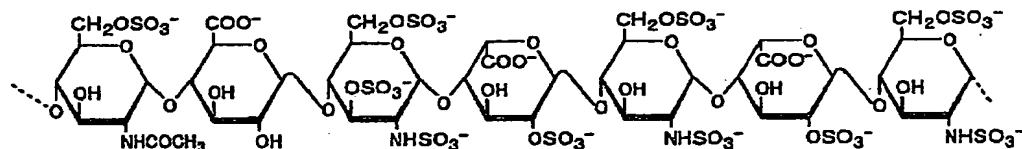
金を有する支持体とを接触させることを特徴とするオリゴ糖鎖の固定化方法。

【請求項7】オリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体の表面に固定化するオリゴ糖鎖の固定化方法であって、請求項5記載のリガンドを含む溶液を、表面にストレプトアビジンを固定化した支持体とを接触させることを特徴とするオリゴ糖鎖の固定化方法。

【請求項8】請求項3または4記載のリガンドを、S-Au結合を介して表面に固定化させてなることを特徴とする蛋白質分析用の支持体。

【請求項9】請求項5記載のリガンドを、ビオチン-ストレプトアビジン結合を介して表面に固定化させてなることを特徴とする蛋白質分析用の支持体。

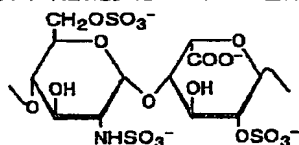
【発明の詳細な説明】



... (6)

【0004】で表される硫酸化多糖ヘパリンは、構造や分子量が非常に不均一なものであり、多くの生物活性を有することが知られている。そのなかでも、抗血液凝固活性は有名であり、医薬として広く用いられている。

【0005】しかしながら、不均一な硫酸化多糖ヘパリンは、血小板やフォンビルブラント因子(vWF)とも結合する。このため、従来、硫酸化多糖ヘパリンを医薬



... (7)

【0008】で表される特定の部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)と、それに基づくクラスティング効果が重要である。

【0009】本願発明者等は、以前に、この特定の部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)が血小板細胞や血液凝固に関わるフォンビルブラント因子(vWF)という蛋白質との結合に大きく関与することを見出した。

【0010】しかしながら、これらの生化学的結合実験のためには特殊な設備や多量のオリゴ糖が必要になるという問題がある。生物活性測定法としては、従来、放射標識法(RI法)とSPR法とが知られているが、RI法は、特殊な実験設備や多量のオリゴ糖を必要とする。

【0011】そこで、本願発明者等は、蛋白質分析用の支持体として非放射標識法である表面プラズモン共鳴(SPR)のセンサチップを使用し、図11に示すように、該センサチップの表面上に、疎水性相互作用を介し

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、オリゴ糖鎖を、表面プラズモン共鳴等のセンサチップやアフィニティークロマトグラフィーの担体等の蛋白質分析用の支持体に一段階で導入し、固定することが可能なリンカー化合物および該リンカー化合物を用いたリガンド並びに該リガンドを用いたオリゴ糖鎖の固定化方法および該リガンドを表面に固定化させてなる蛋白質分析用の支持体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】下記一般式(6)

【0003】

【化6】

として用いた場合における血液中の血小板との結合に起因する副作用が指摘されている。

【0006】これらの結合相互作用には、硫酸化多糖ヘパリン中の、下記一般式(7)

【0007】

【化7】

て上記した部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を固定化し、SPRを用いて硫酸化多糖ヘパリン中の部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)と硫酸化多糖ヘパリン結合性の蛋白質との結合挙動を解析した。SPR法は、少量のオリゴ糖で測定が可能であり、分子間の相互作用をリアルタイムで観測することが可能である。なお、図11中、NS6Sは上記した部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)のうちGlcNS6Sを示し、IdoA2SはIdoA2Sを示し、Gはグルコース単位を示す。

【0012】具体的には、センサチップとしての疎水性チップ上に上記部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を固定化し、この疎水性チップ上に、硫酸化多糖ヘパリン結合性ドメインを有する合成vWFペプチド(vWF中のヘパリン結合サイト; YIGLKDRKRPSLELRRIASQVKYA-NH)をアナライトとして添加した。

【0013】この結果、図12の線aに示すように、vWFペプチドの濃度変化に応じて結合量の変化、すなわち、 $\Delta RU1$ (オリゴ糖の結合量) / $\Delta RU2$ (vWFペプチドの結合量) が観測された。

【0014】この線aのカーブから求められる解離定数 K_D は、以前にSobel等が生化学的手法を用いて測定 (M. Sobel et al. J. Biol. Chem. (1992), vol.267, p8857、 $K_D = 370 \pm 100 \text{ nM}$) した値にオーダーとして近いものであった。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この場合、図12の線bに示すように末端にグルコース残基を有するリガンドを用いても、合成vWFペプチドとの結合相互作用が観測されたことから、上記した値には、疎水性親和力に起因すると思われる非特異的な相互作用、つまり、上記センサチップの疎水性場と合成vWFペプチドとの非特異的な相互作用が含まれていることが判った。

【0016】このため、このように蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用をほぼ無視できるリンカー化合物およびリガンド並びに該リガンドをチップに固定化する方法、さらには、該リガンドを固定化した、例えばSPR用のセンサチップ等の蛋白質分析用の支持体を提供することは、上記した部分二糖構造 (G1cNS6S-I d o A2S) と蛋白質との生化学的結合による結合相互作用、つまり、構造が明確な硫酸化オリゴ糖と種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価する上で非常に重要である。

【0017】また、近年、オリゴ糖鎖が生体内で重要な働きを担っていることが明らかになっている。しかしながら、オリゴ糖鎖の分子レベルでの研究を行うには、上記したように構造が完全に判っているオリゴ糖鎖を用いなければならず、このようなオリゴ糖鎖を多量に天然から得ることは困難であり、また、合成も容易ではないという問題がある。

【0018】また、オリゴ糖鎖は、それ一分子では活性はそれほど高くないことが多く、蛋白質との相互作用を解析するにはオリゴ糖鎖を集合理化させる必要がある。つまり、一般的に、天然のオリゴ糖とそれが相互作用する蛋白質との親和性は低いので、オリゴ糖の生物活性を評価するためには、オリゴ糖鎖を効率よく集合理化することが重要である。

【0019】従来、SPR測定装置等に用いるセンサチップの表面にオリゴ糖鎖を結合 (固定化) する試みとしては、例えば、チップ表面に長鎖アルキル鎖の短分子膜を作り、疎水性相互作用を利用してオリゴ糖鎖をチップに固定化する試み (G.M.Kuziemko et al., Biochemistry, Vol. 35, p6375, 1996年) がなされている。

【0020】しかしながら、上記文献に記載の方法は、

チップ表面に固定化することができるオリゴ糖鎖の種類が限定され、ガングリオシド等の、疎水性基を有するオリゴ糖鎖はチップに固定化することはできるものの、様々なオリゴ糖鎖をチップ表面に簡便に固定化することはできない。また、上記従来の方法によりオリゴ糖鎖が固定化されたチップは、チップ表面の疎水性が高すぎ、チップを用いて分析する蛋白質との非特異的な相互作用が大きく観測されてしまい、実用性に乏しいという問題点を有している。

【0021】また、上記従来の方法でオリゴ糖鎖をチップ表面に固定化するためには、合成化学を駆使し、オリゴ糖鎖の水酸基に種々の保護基をまず導入し、それを化学的に縮合した上で、さらにチップに固定化する必要がある。このため、従来は、自然界から単離、精製して得られるオリゴ糖をそのまま用いてそのオリゴ糖鎖をチップ表面に固定化することは事実上、不可能であった。

【0022】さらに、オリゴ糖鎖と特異的に相互作用する蛋白質を分離精製するためには、構造既知のオリゴ糖鎖をアフィニティークロマトグラフィーのリガンドとして用いる必要がある。

【0023】このため、オリゴ糖鎖を集合理化させ、上記したSPR用のセンサチップまたはアフィニティークロマトグラフィーの担体等の蛋白質分析用の支持体上に固定化させることができると共に、多種のオリゴ糖を一段階で導入することが可能なリンカー化合物および該リンカー化合物を用いたリガンド並びに該リガンドをチップに固定化する方法、さらには、該リガンドを固定化した蛋白質分析用の支持体が求められている。

【0024】本発明は、上記問題点を解決するためになされたものであって、その目的は、自然界から単離、精製して得られる種々のオリゴ糖をそのまま用いて一段階で蛋白質分析用の支持体表面にオリゴ糖鎖を簡便に固定化することができると共に、蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用による影響が低減され、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価できる蛋白質分析用の支持体を得ることができるリンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体を提供することにある。

【0025】

【課題を解決するための手段】本願発明者等は、上記の目的を達成すべく鋭意検討した結果、分子内にS-S結合もしくはビオチンを持たせた部位をリンカー化合物に導入することで、オリゴ糖鎖を分子内に簡便に導入できる部分をリンカー化合物に組み込むと共に、オリゴ糖鎖の導入に際し、親水性部分がリンカー化合物との間に形成されるように、蛋白質分析用の支持体表面に例えばコートした金もしくは予め蛋白質分析用の支持体表面に固定化したストレプトアビジン (またはアビジン) と結合させ易く、強固に結合できるようにすることができ、自

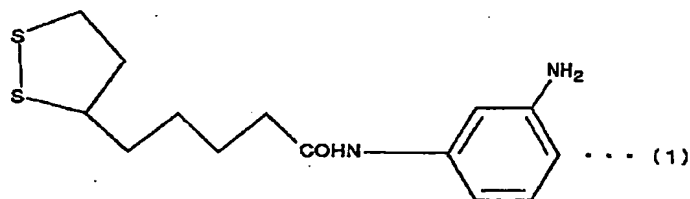
自然界から単離、精製して得られる種々のオリゴ糖をそのまま用いて蛋白質分析用の支持体表面にオリゴ糖鎖を一段階で簡便に固定化することができると共に、蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用による影響が低減され、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評

価できる蛋白質分析用の支持体を得ることができることを見出して本発明を完成させるに至った。

【0026】即ち、本発明にかかるリンカー化合物は、上記の課題を解決するために、一般式(1)

【0027】

【化8】

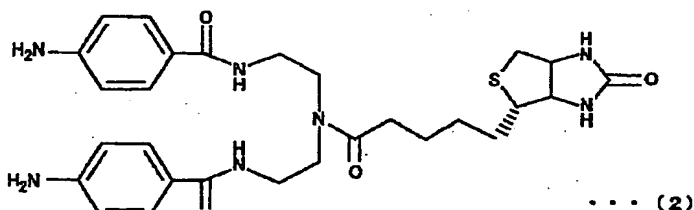


【0028】で表されることを特徴としている。

【0029】また、本発明にかかるリンカー化合物は、上記の課題を解決するために、一般式(2)

【0030】

【化9】

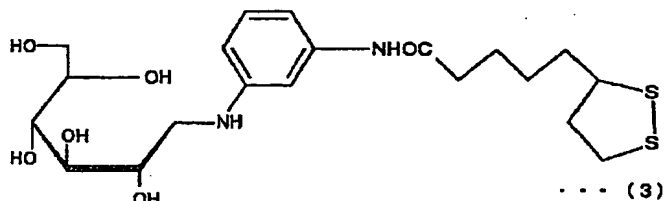


【0031】で表されることを特徴としている。

【0032】本発明にかかるリガンドは、上記の課題を解決するために、一般式(3)

【0033】

【化10】

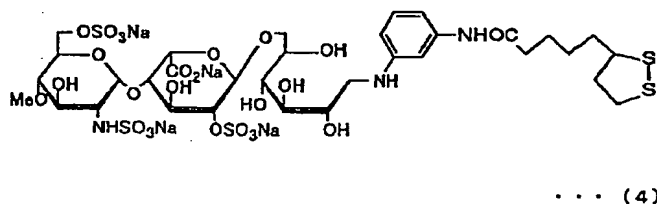


【0034】で表されることを特徴としている。

【0035】本発明にかかるリガンドは、上記の課題を解決するために、一般式(4)

【0036】

【化11】

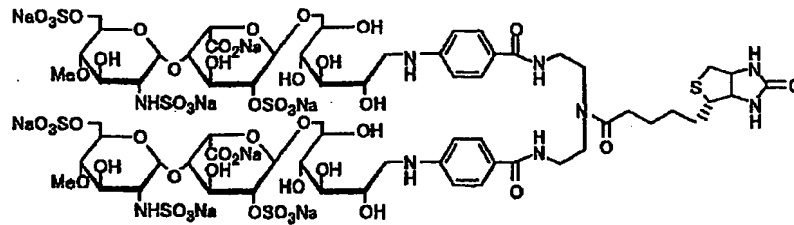


【0037】で表されることを特徴としている。

【0038】本発明にかかるリガンドは、上記の課題を解決するために、一般式(5)

【0039】

【化12】



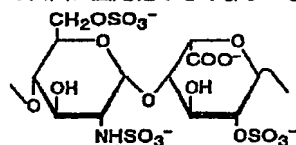
【0040】で表されることを特徴としている。

【0041】本発明にかかるオリゴ糖鎖の固定化方法は、上記の課題を解決するために、オリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体の表面に固定化するオリゴ糖鎖の固定化方法であって、上記一般式(3)または(4)で表されるリガンドを含む溶液と、表面に金を有する支持体とを接触させることを特徴としている。

【0042】本発明にかかるオリゴ糖鎖の固定化方法は、上記の課題を解決するために、オリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体の表面に固定化するオリゴ糖鎖の固定化方法であって、上記一般式(5)で表されるリガンドを含む溶液と、表面にストレプトアビジン(またはアビジン)を固定化した支持体とを接触させることを特徴としている。

【0043】本発明にかかる蛋白質分析用の支持体は、上記の課題を解決するために、上記一般式(3)または(4)で表されるリガンドを、S-Au結合を介して表面に固定化させてなることを特徴としている。

【0044】本発明にかかる蛋白質分析用の支持体は、上記の課題を解決するために、上記一般式(5)で表されるリガンドを、ビオチン-ストレプトアビジン(またはアビジン)結合を介して表面に固定化させてなること



【0048】で表される特定の部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を二次元的に固定し、上記部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)と種々の蛋白質との結合相互作用を評価するシステムについて主に説明するが、本発明は、これに限定されるものではない。

【0049】本発明では、オリゴ糖鎖を簡便に導入できる部位をリンカー化合物に組み込み、オリゴ糖鎖をリンカー化合物に導入した際に親水性部分がリンカー化合物との間に形成されるリガンド、すなわち、蛋白質と特異

を特徴としている。

【0045】

【発明の実施の形態】〔実施の形態1〕以下、本発明について詳細に説明する。本願発明者等は、自然界から単離、精製して得られる種々のオリゴ糖をそのまま用いて一段階で蛋白質分析用の支持体表面にオリゴ糖鎖を簡便に固定化することができると共に、蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用による影響が低減され、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価できる蛋白質分析用の支持体を得るべく、表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて、構造が明確な硫酸化オリゴ糖を上記SPRのセンサチップに効率よく固定化し、種々の蛋白質との結合相互作用を連続的かつ定量的に評価できるシステムの開発を行った。

【0046】以下の説明では、蛋白質分析用の支持体としてSPRのセンサチップを使用して該センサチップに、構造が明確な硫酸化オリゴ糖である硫酸化多糖へパリン中の下記一般式(7)

【0047】

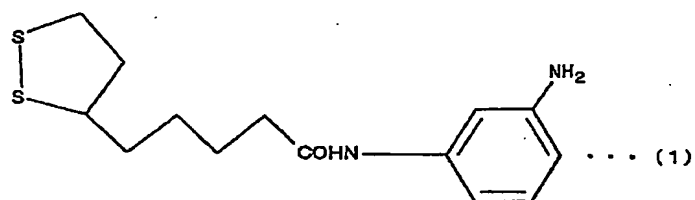
【化13】

的に結合する物質を得た。これにより、本発明においては、リガンドを直接、蛋白質分析用の支持体に共有結合させ、これによりオリゴ糖を蛋白質分析用の支持体表面に固定化している。

【0050】本発明にかかるリンカー化合物は、分子内にジスルフィド結合を有する化合物であり、一般式(1)

【0051】

【化14】

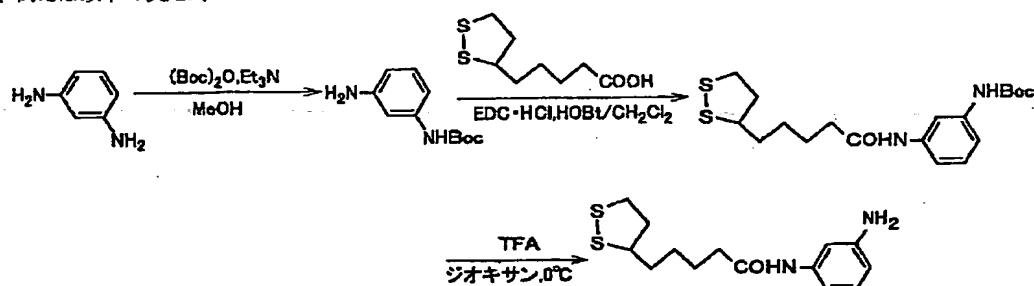


【0052】で表される構造を有している。

【0054】

【0053】上記一般式(1)で表されるリンカー化合物は、例えば以下の反応式

【化15】



【0055】で示される反応により容易に得ることができる。

(CH₃)₃基; 式中、Boc基と記す)で保護(Boc化)することにより、下記一般式(9)

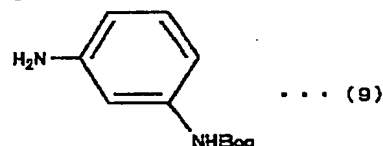
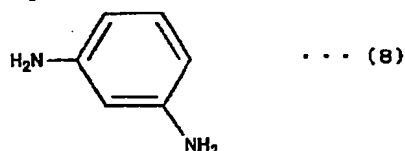
【0056】先ず、芳香族ジアミンである下記一般式(8)

【0059】

【0057】

【化17】

【化16】



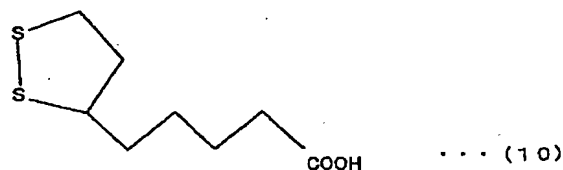
【0058】で表されるm-フェニレンジアミンを、上記反応式に示すように、CH₃OH(式中、MeOHと記す)および(C₂H₅)₃N(式中、Et₃Nと記す)の存在下、((CH₃)₃COCO)₂O(式中、(Boc)₂Oと記す)と反応させることにより、上記一般式(8)で表されるm-フェニレンジアミンの一方のアミノ基を、t-ブトキシカルボニル基(-COCO

【0060】で表される化合物が得られる。

【0061】次に、上記一般式(9)で表される化合物を、上記反応式に示すように、CH₂Cl₂中、水溶性カルボジイミド(式中、EDC·HClと記す)、並びに、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(式中、HOBTと記す)の存在下で、ジスルフィド結合を有する下記一般式(10)

【0062】

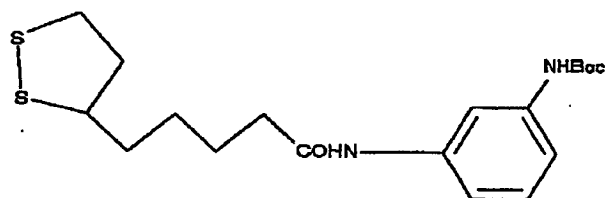
【化18】



【0063】で表されるチオクト酸と縮合反応させることにより、下記一般式(11)

【0064】

【化19】



... (11)

【0065】で表される化合物が得られる。

【0066】次いで、上記一般式(11)で表される化合物を、上記反応式に示すように、ジオキサンの存在下、例えば0℃にてトリフルオロ酢酸(式中、TFAと記す)によりBoc基を除去することにより、分子内にジスルフィド結合を有する前記一般式(1)で表されるリンカー化合物が得られる。

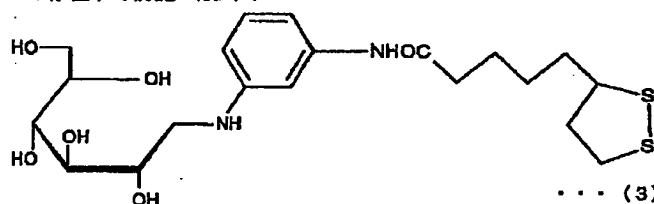
【0067】本実施の形態では、前記一般式(8)で表されるm-フェニレンジアミンの一方のアミノ基をBoc化して前記一般式(9)で表される化合物を78%の収率で得た後、該一般式(9)で表される化合物をEDC・HClおよびHOBTの存在下で前記一般式(1)

0)で表されるチオクト酸と縮合反応させることにより、前記一般式(11)で表される化合物を収率86%で調製した。その後、前記一般式(11)で表される化合物をジオキサンの存在下、0℃にてTFAでBoc基を除去することにより、前記一般式(1)で表される目的のリンカー化合物を収率85%で得た。

【0068】続いて、このリンカー化合物の反応性を確認するために該リンカー化合物をグルコースと反応させたところ、下記一般式(3)

【0069】

【化20】



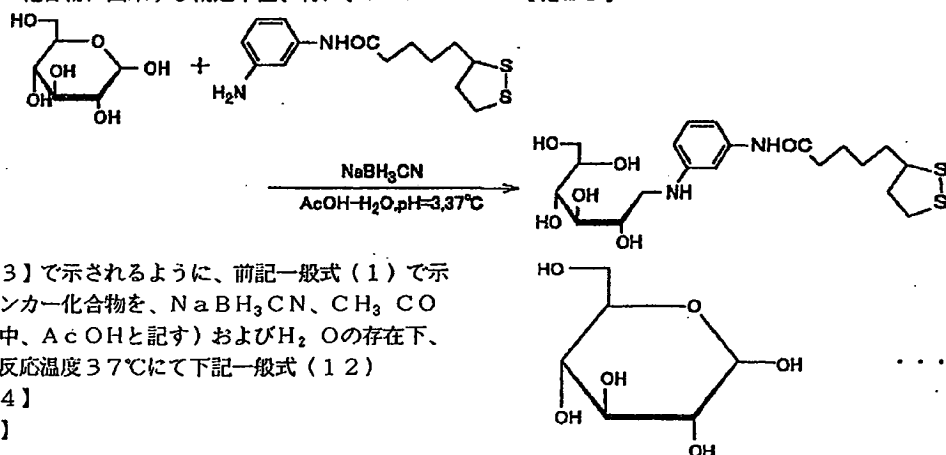
... (3)

【0070】で表される親水性のリガンドを合成することができた。

【0071】すなわち、本発明にかかる上記一般式(3)で表されるリガンドは、グルコースをリンカー化合物に導入することにより、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物に由来する構造単位、特に、ジスルフィド結合をその分子内に有すると共に、グルコースの導入、ひいてはオリゴ糖鎖の導入に際し、親水性部分がリンカー化合物との間に形成される親水性のリガンドであり、下記反応式

【0072】

【化21】



... (12)

【0073】で示されるように、前記一般式(1)で示されるリンカー化合物を、 NaBH_3CN 、 CH_3COOH (式中、AcOHと記す)および H_2O の存在下、pH3、反応温度37℃にて下記一般式(12)

【0074】

【化22】

【0075】で表されるD-グルコースと還元アミノ化反応させることにより容易に調製することができる。

【0076】本実施の形態では、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物を上記条件下で一般式(12)で表されるD-グルコースと還元アミノ化反応させることにより、還元末端を効率良く利用して、前記一般式(3)で表される、親水性のリガンドを92%という高収率で得た。

【0077】このように分子内にジスルフィド結合(S-S結合)を持たせた部位をリンカー化合物に導入することで、該リンカー化合物を例えばSPRのセンサーチップ等をはじめとする蛋白質分析用の支持体表面にコートした金とイオウ-金結合(S-Au結合)させ易く、かつ、これら蛋白質分析用の支持体に、上記リンカー化合物に結合させたオリゴ糖鎖、つまり、上記したリンカー化合物を用いたリガンド中に含まれるオリゴ糖鎖を強固に結合させることができる。

【0078】すなわち、本発明によれば、リンカー分子内にジスルフィド結合を組み込んだ上記のリガンドを用いることで、該リガンドを例えばS-Au結合を介して蛋白質分析用の支持体に共有結合により直接結合させることができる。このため、上記のリガンド、すなわち、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物に由来する

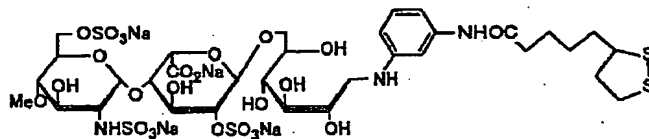
構造単位を含むリガンドを用いれば、オリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体表面に簡便に固定化することができると共に、蛋白質分析用の支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用をほぼ無視することができるシステムを構築することができる。

【0079】次に、上記したリンカー化合物並びにリガンドに由来する構造単位を有する本発明にかかるリガンドとして、前記一般式(7)で表される特定の部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を有するリガンドについて以下に説明する。

【0080】本発明にかかる上記リガンドは、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物を前記一般式(7)で表される部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を含む化合物と反応させることにより上記部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を前記した本発明にかかるリンカー化合物に導入してなるリガンドであり、下記一般式(4)

【0081】

【化23】



... (4)

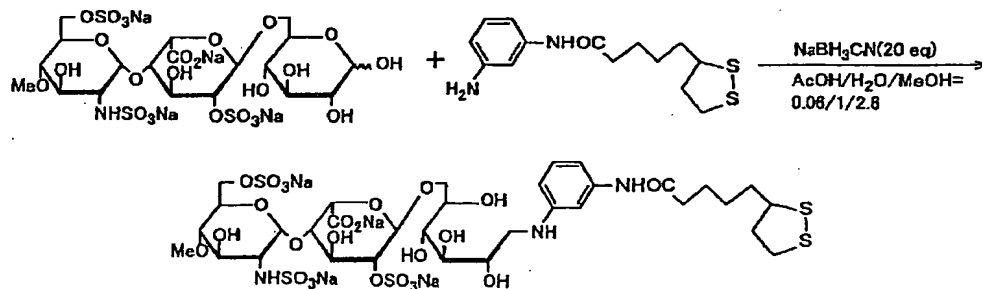
【0082】で表される構造を有している。

【0083】このため、上記一般式(4)で表されるリガンドもまた、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物に由来する構造単位、特に、ジスルフィド結合をその分子内に有している。

【0084】上記一般式(4)で表される構造を有するリガンド(GlcNS6S-IdoA2S-Ligand)は、下記反応式

【0085】

【化24】

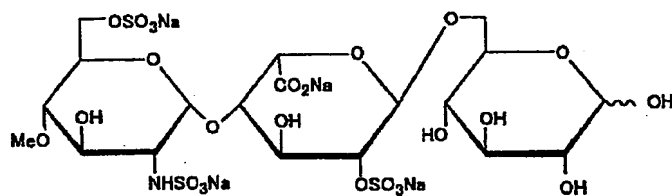


【0086】で示されるように、～パリンの部分構造である二糖、すなわち、前記一般式(7)で表される部分二糖構造(以下、GlcNS6S-IdoA2Sと記す)の還元末端にグルコース単位を挿入した、下記一般

式(13)

【0087】

【化25】



... (13)

【0088】で表される構造を有する三糖を公知の方法で別途合成しておき、この三糖と前記一般式(1)で表されるリンカー化合物とを、 CH_3COOH (式中、 AcOH と記す)/ $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (式中、 MeOH と記す)の混合溶媒中にて、 NaBH_3CN の存在下、最適化した還元アミノ化反応させることによって調製することができる。上記三糖は、例えば「S. Koshida et al., Tetrahedron Lett. Vol. 42, p1289, 2001年」に記載の方法により合成することができる。表1に、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物と三糖との反応条件を示す。なお、 NaBH_3CN は、10当量(eq)ずつ複数回に分けて添加した。

【0089】

【表1】

反応例	三糖 (eq)	リンカー化合物 (eq)	NaBH_3CN (eq)	溶媒及びモル比	反応日数	反応温度 ($^{\circ}\text{C}$)	収率
1	1.0 ^a	1.0 ^a	10+10+10	$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}=1/1$	6	37	No reaction
2	1.0 ^a	1.0 ^a	10+10	$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}=1/1$	3	60	No reaction
3	1.0 ^a	1.0 ^a	10+10	$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{ジオキサン}=1/1/1$	3	37	No reaction
4	1.0 ^a	1.0 ^a	10+10	$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=0.06/1/2$	4	37	16%
5	1.0 ^b	2.8 ^c	10+10	$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}=0.06/1/2.6$	3	37	36%

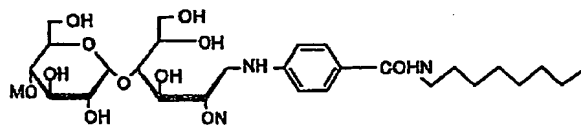
【0090】なお、表1中、a)は6mM、b)は13mM、c)は37mMを示す。

【0091】前記一般式(1)で表されるリンカー化合物は、酢酸・水・メタノール溶媒系に溶解する。表1か

ら判るように、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物は、酢酸・水・メタノール溶媒系にて NaBH_3CN の存在下で三糖と反応し、例えば反応例5に示す条件下で前記一般式(1)で表されるリンカー化合物と三糖とを反応させることにより、本発明にかかる目的のリガンド($\text{GlcNS6S-IdoA2S-Ligand}$; $\text{ESI-MS (negative) } m/z = 1072.15 [M - 3\text{Na} + 2\text{H}]^-$)を得ることができる。

【0092】このようにして得られた本発明にかかるリガンドは、分子内にS-S結合を有し、これらリガンドを含む溶液と、表面に金を有する蛋白質分析用の支持体、例えば金をコートした前記SPRのセンサーチップ等のチップとを接触させることにより、これらリガンドに含まれるオリゴ糖鎖、つまり、前記一般式(1)で表されるリンカー化合物に組み込んだオリゴ糖のオリゴ糖鎖を、例えば図1に示すようにAu-S結合を介して、一段階で上記蛋白質分析用の支持体表面に固定化させることができる。これにより、図1に示すように、分子内にジスルフィド基を有するリンカー化合物を還元アミノ化反応によって一段階で糖鎖に縮合させ、これをAu-S結合を介してチップ上に固定化して部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)の二次元クラスターを形成させてなるセンサーチップが得られる。なお、図1中、NS6Sは上記した部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)のうち GlcNS6S を示し、I2Sは IdoA2S を示し、Gはグルコース単位を示す。

【0093】本発明にかかる上記した各リガンドを用い



【0098】で表される従来のリガンドを用いて疎水性相互作用を介してオリゴ糖類(マルトース)をチップに結合させた場合(図2中、線Aにて示す)における非特異的相互作用によるレスポンス(RU: Resonance Unit)と前記一般式(3)で表される本発明のリガンドを用いてAu-S結合を介してグルコースをチップに結合させた場合(図2中、線Bにて示す)における非特異的相互作用によるレスポンス(RU)との比較を示している。なお、バッファにはpH7.4のリン酸緩衝食塩水(PBS)を使用した。また、バッファの流量は $5\mu\text{l}/\text{min}$ とした。

【0099】BSAはマルトースやグルコースには相互作用しないことが判っているが、前記一般式(14)で表される従来のリガンドによる疎水性相互作用を利用した測定系では、疎水性チップ上にこのようなグルコース構造をもったリガンドを固定化し、その上に疎水性蛋白質であるBSAを加えたところ、線Aに示すように大きなレスポンス(RU)が観測され、1240もの共鳴角

で蛋白質分析用の支持体表面に一段階でオリゴ糖鎖を固定化する際に用いられる上記リガンドを含む溶液としては、特に限定されるものではないが、具体的には、例えば、これらリガンドのメタノール溶液等が挙げられる。

【0094】本実施の形態においては、前記一般式(3)または(4)で表されるリガンドのメタノール溶液(0.1mM)に、表面を金でコーティングしたガラス製のチップを2時間浸漬し、前記一般式(3)または(4)で表されるリガンド中のS-S結合をチップ表面の金とのAu-S結合に変換させることによって、オリゴ糖をチップ表面に固定化させた。このようにして調製した2種類のチップの非特異的相互作用を、ウシ血清アルブミン(以下、BSAと記す)を試料として使用し、表面プラズモン共鳴装置(日本レーザー電子社製、SPR670)を用いて測定することにより検討した。

【0095】なお、上記測定においては、比較のために、「G.M.Kuziemko et al, Biochemistry, Vol. 35, p 6375, 1996年」に報告されているような疎水性相互作用を介してチップ表面にオリゴ糖鎖を固定化した場合におけるチップの非特異的相互作用を、 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ のBSAを試料として使用し、表面プラズモン共鳴装置(日本レーザー電子社製、SPR670)を用いて測定した。

【0096】図2は、下記一般式(14)

【0097】

【化26】

度変化(ΔRU)が観測され、非特異的な結合が起こっていることが判る。

【0100】これは、BSAとチップ上の疎水性場との非特異的な相互作用によるものであり、このように大きな非特異的相互作用があると、特異的相互作用を観測するのは非常に困難になる。

【0101】一方、同じ濃度のBSAを、Au-S結合を介してグルコース単位を固定化したチップ、すなわち、ジスルフィド結合を有する本発明にかかる親水性リガンドを固定化したチップ上加えたところ、線Bに示すように、レスポンス(RU)はほぼ直線となり、非特異的な結合は殆ど観測されなかった。このことから、前記一般式(3)で表される本発明のリガンドを用いてAu-S結合を介してグルコースをチップに結合させた場合、疎水性相互作用に基づく非特異的相互作用は無視できることが判った。

【0102】また、同様に、前記一般式(4)で示されるリガンドを用いて上述した方法によりヘパリンの部分

二糖構造 (GlcNS6S-I doA2S) を固定化したチップを用いて、BSA、並びに、ヒト由来フォンビルプラント因子蛋白質中のヘパリン結合ドメインである合成vWFペプチド (vWF中のヘパリン結合サイト: YIGLKDRKRPSELRRIASQVKYA-NH) との相互作用によるレスポンス (RU) を、表面プラズモン共鳴装置 (日本レーザー電子社製、SPR670) を用いて測定した。

【0103】図3中、線Cは試料として0.1mg/mlのBSAを使用した場合のレスポンス (RU) を示し、線Dは試料として2μMの合成vWFペプチドを使用した場合のレスポンス (RU) を示す。なお、バッファにはpH7.4のPBSを使用した。また、バッファの流量は5μl/minとした。

【0104】BSAはヘパリンと非特異的に僅かに相互作用することが知られているが、上記測定の結果、線Cに示すように、僅かに相互作用はみられるが、その強さはほぼ無視できる程度であることが判明した。

【0105】一方、ヘパリンと結合相互作用することが確認されている、ヒト由来フォンビルプラント因子蛋白質中のヘパリン結合ドメインである、2μMの合成vWFペプチドをBSAの代わりに用いてSPRを測定したところ、線Dに示すように明らかな結合曲線が観測され、非常に高い相互作用があることが判った。このことから、上記したチップを用いた場合には疎水性相互作用による非特異的な相互作用の影響を無視できると考え、合成vWFペプチドの解離定数 K_D を求めた。

【0106】図4は、合成vWFペプチドの濃度を0.05μMから2.0μMまで連続的に変化させて前記一般式(4)で表されるリガンドを固定化したチップ上に加えた場合の結合曲線を示す。なお、図4中、↑は合成vWFペプチドの注入を示し、↓はバッファに切り替わったことを示す。また、合成vWFペプチドのチップへの固定化量は、vWFペプチド注入前のベースライン (図中、点線にて示す) から、バッファに切り替わった後、合成vWFペプチドが解離して平行に達したところまでの差をそれぞれとっている。なお、上記測定においても、バッファにはpH7.4のPBSを使用し、バッファの流量は5μl/minとした。また、表面プラズモン共鳴装置には、日本レーザー電子社製の表面プラズモン共鳴装置「SPR670」を用いた。

【0107】図5の線Eは、このときの固定量の変化、すなわち、前記一般式(4)で表されるリガンドを固定化したチップを用いた場合における合成vWFペプチドのチップへの固定化量の変化 (レスポンス (RU)) を合成vWFペプチドの濃度に対してプロットした図である。

【0108】図5に示すように上記合成vWFペプチドの濃度を変化させて該合成vWFペプチドのそれぞれの濃度に対するレスポンス (RU) から結合度を測定し、

該結合度から解離定数 K_D を算出したところ、線Eで示すように、前記一般式(4)で表されるリガンド (GlcNS6S-I doA2S-ligand) を用いた場合には、Sobel等が放射標識法によって求めた値 (M. Sobel et al. J. Biol. Chem. (1992), vol.267, p8857、 $K_D = 370 \pm 100$ nM) と非常に近い値 ($K_D = 210$ nM) が導かれた。

【0109】一方、前記一般式(3)で表されるリガンド (親水性リガンド) を固定化したチップ上に合成vWFペプチドを上記と同様に注入したが、この場合は、図5の線Fに示すように、合成vWFペプチドと該チップとの結合相互作用は殆ど観測されず、非特異的な相互作用はないことが確認された。

【0110】以上のように前記一般式(3)で表されるリガンドを固定化したチップを用いてvWF中のヘパリン結合ドメインを含む合成ペプチドとの結合挙動をSPRで測定した結果、特異的な相互作用のみが観測され、さらに天然ヘパリンとこの合成ペプチド (合成vWFペプチド) との解離定数 K_D にほぼ等しい値がSPR解析から得られたことから、このチップの有用性が明らかとなった。

【0111】また、以上のことから、本発明にかかる上記各リガンド並びにこれらリガンドに用いられる前記一般式(1)で表されるリンカー化合物は、オリゴ糖鎖を、例えばAu-S結合を介して、蛋白質分析用の支持体表面に固定化するために非常に優れた性質を有する化合物であることが明らかになった。

【0112】以上のように、本発明によれば、還元アミノ化反応によって、硫酸化二糖、すなわち、ヘパリンの部分二糖構造 (GlcNS6S-I doA2S) に、分子内にジスルフィド結合を有するリンカーを導入することができた。そして、このようにして合成したリガンドを用いて、硫酸化二糖をAu-S結合を介してチップへ固定化することにより、チップとの非特異的な相互作用を無視できる実験系を確立することができた。さらに、このチップを用いると、硫酸化二糖と合成vWFペプチドとの特異的な相互作用を観測することができることが判った。

【0113】なお、本発明においては、ヘパリン結合性蛋白質として上記した合成vWFペプチドを使用した。が、本発明はこれに限定されるものではなく、上記したチップを用いることで、他のヘパリン結合性蛋白質との結合挙動も解析することが可能である。

【0114】以上のように、本発明によれば、上記のリンカー化合物を用いれば、還元末端を有しているオリゴ糖鎖をチップ表面に簡便に固定化できるようになったばかりでなく、チップを用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基づく非特異的な相互作用をほぼ無視することができるシステムを構築することができた。

【0115】さらに、本願発明者等は、オリゴ糖の生物

活性を評価するために、オリゴ糖を効率良く集合化し、多糖のオリゴ糖を一段階で蛋白質分析用の支持体表面に導入すべく鋭意検討した。この結果、本願発明者等は、図6に示すように多価の芳香族アミン部分とビオチン部分とを有するリンカー化合物（ビオチンリンカー）を用いてオリゴ糖鎖を集合化させ、該オリゴ糖鎖を、ビオチン-ストレプトアビジン（またはアビジン）の結合を利用してSPRのセンサチップ等のチップやアフィニティークロマトグラフィーの担体等の蛋白質分析用の支持体表面に固定化することで、多糖のオリゴ糖を一段階で蛋白質分析用の支持体表面に導入し、オリゴ糖の集合化と固定化との両方を実現することができることを見出した。なお、図6並びに以下に示す図において、Stはストレプトアビジン（またはアビジン）を示し、Biはビ

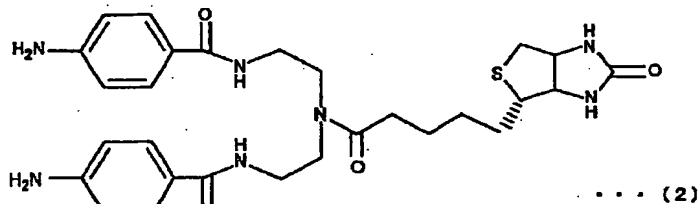
オチンを示す。

【0116】以下、本発明にかかる他のリンカー化合物として、分子内にS-S結合を持たせた部位の代わりにビオチンをリンカー化合物に導入してなるビオチンリンカーについて説明すると共に、該ビオチンリンカーを用いたリガンド並びに該リガンドを用いたオリゴ糖鎖の固定化方法および該リガンドを固定化させた、蛋白質分析用の支持体について説明する。

【0117】本発明にかかる他のリンカー化合物は、ビオチンと複数個のオリゴ糖を結合させ得る反応点を併せ持った多岐用途型リンカーであり、一般式（2）

【0118】

【化27】

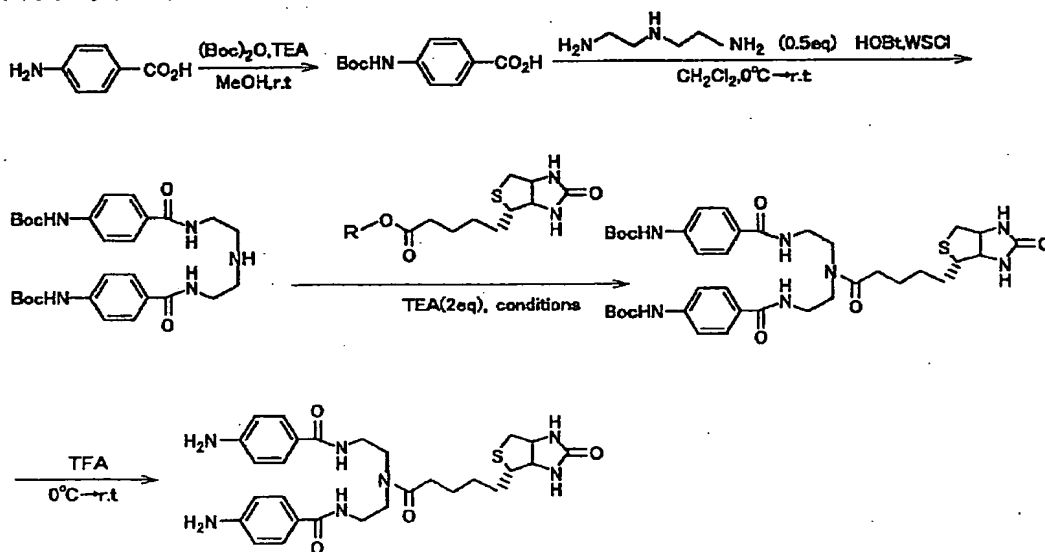


【0119】で表される構造を有している。

【0120】上記一般式（2）で表されるリンカー化合物は、例えば以下の式

【0121】

【化28】

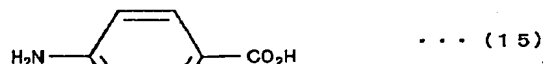


【0122】で示される反応により容易に得ることができる。

【0123】先ず、上記の反応式にしたがって下記一般式（15）

【0124】

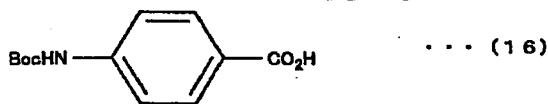
【化29】



【0125】で表されるp-アミノ安息香酸を、MeOHおよびトリエチルアミン（TEA）の存在下、(Boc)₂Oと室温にて反応させて上記一般式（15）で表されるp-アミノ安息香酸のアミノ基をBoc基で保護（Boc化）することにより、下記一般式（16）

【0126】

【化30】



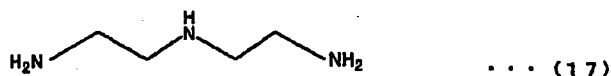
【0127】で表される化合物が得られる。

般式 (17)

【0128】次に、反応温度を0℃から室温に昇温させて、上記一般式(16)で表される化合物を、CH₂Cl₂中、HOBt、EDC、HClの存在下で、下記一

【0129】

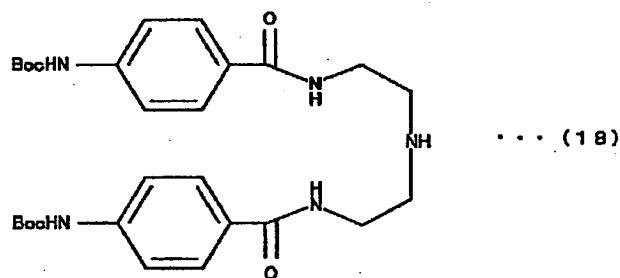
【化31】



【0130】で表されるジエチレントリアミン(0.5当量)と反応させて縮合させることにより、下記一般式(18)

【0131】

【化32】



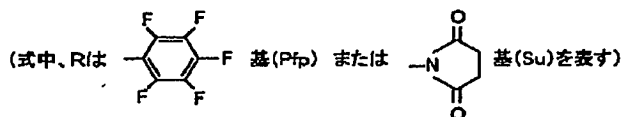
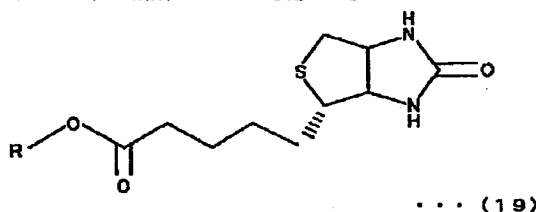
【0132】で表される化合物が得られる。

し、TEA(2当量)の存在下で、下記一般式(19)

【0133】次に、上記一般式(18)で表される化合物をN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解

【0134】

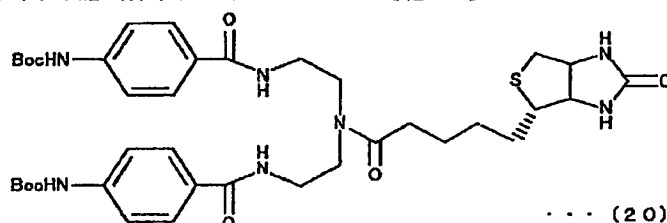
【化33】



【0135】で表される、ビオチンの活性エステル化合物と反応させることにより、下記一般式(20)

【0136】

【化34】



【0137】で表される化合物が得られる。

で表される化合物のBoc基、すなわち、アミノ基の保護基を外す(脱保護することにより、本発明にかかるリンカー化合物として、前記一般式(2)で表される、

【0138】次いで、反応温度を0℃から室温に昇温させてトリフルオロ酢酸(TFA)で上記一般式(20)

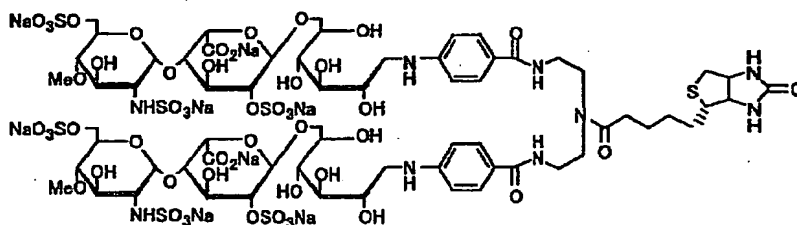
糖鎖を二単位集合化させるためのビオチンリンカーが得られる。

【0139】本実施の形態では、上記一般式(15)で表されるp-アミノ安息香酸のアミノ基をBoc基で保護(Boc化)することにより、一般式(16)で表される化合物を収率75%で得た後、該一般式(16)で表される化合物を上記した条件下で一般式(17)で表されるジエチレントリアミン(0.5当量)と反応させることにより、収率93%で一般式(18)で表される化合物を調製した。その後、上記一般式(18)で表される化合物を、上記した条件下で一般式(19)で表されるビオチンの活性エステル化合物と反応させることにより、一般式(20)で表される化合物(ESI-MS (positive) $m/z=524.4$ [M+H]⁺)を得た。上記ビオチンの活性エステル化合物並びに反応式中、conditionsの表記にて示す反応条件(溶媒および反応温度)を変更した場合における上記一般式(20)で表される化合物の各収率を表2に示す。

【0140】

【表2】

反応例	R	Conditions	収率
1	Su	DMF, r.t→50℃	45%
2	Pfp	DMF, r.t	63%



... (5)

【0146】で表される構造を有し、前記一般式(2)で表されるリンカー化合物にヘパリン中の硫酸化部分二糖(GlcNS6S-IdoA2S)が導入された構造を有している。

【0147】これにより、上記一般式(5)で表されるリガンドは、前記一般式(2)で表されるリンカー化合物に由来する構造単位を有し、ビオチンとstreptavidin(またはアビジン)との高い親和性を利用してオ

【0141】表2に示すように、ビオチン活性化エステルとして、ペンタフルオロフェニル基(Pfp)を用いた系により、目的とする上記一般式(18)で表される化合物を最も収率良く得ることができた。

【0142】続いて、TFAで上記一般式(18)で表される化合物のBoc基を脱保護することにより、上記ビオチンリンカー、すなわち、前記一般式(2)で表されるリンカー化合物を収率91%で得た。

【0143】続いて、このリンカー化合物を用いてオリゴ糖鎖を集合化させた。集合化させる糖鎖には、血液凝固に関わるフォンビルブラント因子ペプチド(vWFペプチド)と相互作用する、ヘパリン中の硫酸化部分二糖、すなわち、前記一般式(7)で表される部分二糖構造(GlcNS6S-IdoA2S)を使用した。

【0144】すなわち、上記ビオチンリンカーを用いた本発明にかかるリガンドは、下記一般式(5)

【0145】

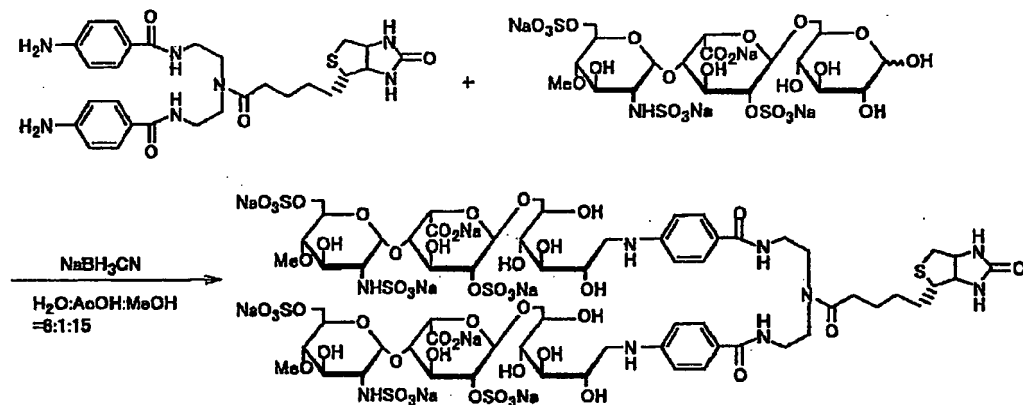
【化35】

リゴ糖鎖として上記硫酸化部分二糖(GlcNS6S-IdoA2S)をビオチン-streptavidin(またはアビジン)結合により蛋白質分析用の支持体に固定化させることができる。

【0148】上記一般式(5)で表されるリガンドは、下記反応式

【0149】

【化36】



【0150】で示されるように、最適化した還元アミノ化反応を用いて、上記硫酸化部分二糖を含む三糖体、すなわち、ヘパリン中の部分構造二糖 (GlcNS6S-I doA2S) の還元末端にグルコース単位を導入した前記一般式 (13) で表される三糖を、 $H_2O/AcOH/MeOH$ の混合溶媒に溶解し、 $NaBH_3CN$ の存在下で前記一般式 (2) で表される、多岐用途型のリンカー化合物であるビオチンリンカーに導入することにより調製した。

【0151】表3に、前記一般式 (2) で表されるリンカー化合物と三糖との反応条件を示す。

【0152】

【表3】

反応例	溶媒及びモル比	収率
1	$H_2O:AcOH=1:1$	No reaction
2	$H_2O:AcOH:MeOH=15:1:6$	47%
3	$H_2O:AcOH:MeOH=6:1:15$	60%

【0153】表3から判るように、前記一般式 (2) で表されるリンカー化合物は、酢酸・水・メタノール溶媒系にて $NaBH_3CN$ の存在下で三糖と反応し、例えば反応例3に示す条件下で前記一般式 (2) で表されるリンカー化合物と三糖とを反応させることにより、糖鎖が2単位集合化した本発明にかかる目的のリガンド、すなわち、ヘパリン部分二糖構造を2単位含む、上記一般式 (5) で表される多岐用途型のリガンド (オリゴ糖鎖リガンド; ESI-MS (negative) $m/z=523.8 [M-7Na+3H]^-$) を得ることができた。

【0154】次に、上記オリゴ糖鎖リガンドを使用し、SPRにより、該オリゴ糖鎖リガンドと合成vWFペプチドとの相互作用を確認した。まず、上記一般式 (5) で表される化合物をストレプトアビジンを固定化したSPRのセンサチップ表面上にビオチン-ストレプトアビジンの高い親和性を利用して配列させ、ヘパリン結合性のモデルペプチドとの相互作用を調べ、その有用性を検討した。

【0155】ここで、オリゴ糖鎖リガンドをSPRのセンサチップ上に固定化する操作について、図7(a)~(d)を参照して以下に説明する。

【0156】本発明にかかる上記オリゴ糖鎖リガンドは、該オリゴ糖鎖リガンドを含む溶液と、予めストレプトアビジンを固定化したSPRのセンサチップ (ストレプトアビジン固定化チップ) とを接触させることにより、該オリゴ糖鎖リガンドに含まれるオリゴ糖鎖、つまり、上記ビオチンリンカーに組み込んだオリゴ糖のオリゴ糖鎖を一段階でSPRのセンサチップ表面に固定化させることができる。

【0157】ストレプトアビジン固定化チップは、図7(a)に示すようにガラス基盤表面に金をコーティングしたSPRのセンサチップに、図7(b)に示すようにAu-S結合を利用して下記一般式 (21)

【0158】

【化37】



【0159】で表される4,4-ジチオジ酪酸を固定化させ、図7(c)に示すように固定化させた4,4-ジチオジ酪酸を水可溶性のカルボジイミドの存在下でN-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させて活性化した後、図7(d)に示すようにストレプトアビジンの末端アミノ基を縮合させることにより作成、つまり、ストレプトアビジンを固定化することができる。

【0160】図8はSPRのセンサチップ上にストレプトアビジンを固定化した時のSPRのセンサグラムの結果の一例であり、横軸はランニングバッファのフロー時間を示し、縦軸は共鳴角度変化 (RU: Resonance Unit) を示す。

【0161】また、図8中、矢印Xはストレプトアビジン溶液の注入を示し、矢印Yはランニングバッファに自動的に切り替わったことを示す。なお、ランニングバッファにはpH7.4のPBSを使用し、その流量は $5 \mu l/min$ とした。また、表面プラズモン共鳴装置には、日本レーザー電子社製の表面プラズモン共鳴装置「SPR670」を用いた。そして、結合に関与しな

ったストレプトアビジンをランニングバッファで洗い流し、チップ上に残存する活性エステルを1 Mアミノエタノールによりキャッピングした。最終的なストレプトアビジンの固定化量はストレプトアビジン注入前のベースラインと、アミノエタノールによるキャッピングの後の共鳴角度変化の差とした。このセンサグラムでのストレプトアビジンの固定化量は2930 RUであった。

【0162】本発明にかかるオリゴ糖鎖リガンドは、このようにして作成したストレプトアビジン固定化チップに、ビオチン-ストレプトアビジンの高い親和性を利用して固定化させることが可能であり、上記オリゴ糖鎖リガンドを用いれば、前記したように該オリゴ糖鎖リガンドを含む溶液と、予めストレプトアビジンを固定化したSPRのセンサチップとを接触させることにより、該センサチップ表面に集合化されたオリゴ糖鎖を一段階で固定することができる。

【0163】このときに用いられる上記オリゴ糖鎖リガンドを含む溶液としては、具体的には、例えば、上記オリゴ糖鎖リガンドのPBS溶液等が挙げられる。

【0164】本実施の形態によれば、上記オリゴ糖鎖リガンドを含む溶液、例えば上記オリゴ糖鎖リガンドのPBS溶液に、ストレプトアビジンを固定化した上記センサチップを浸漬するかもしくは後述するようにストレプトアビジンを固定化したセンサチップにオリゴ糖鎖リガンドを含む溶液を注入して既知のビオチン-アビジン特異的結合相互作用を用いたビオチン-ストレプトアビジン結合によって上記オリゴ糖鎖リガンドを上記センサチップに固定化させることにより、表面にヘパリン部分二糖構造を有するセンサチップを作成することができた。

【0165】次に、このセンサチップを用いてvWFペプチドとの結合定数 K_D を測定した。図9(a)は、ストレプトアビジンを固定化したSPRのセンサチップを示す。上記vWFペプチドとの結合定数の測定に際しては、図9(a)に示すセンサチップに、濃度を変えてオリゴ糖鎖リガンドを含むPBS溶液を注入して図9

(b)に示すように該オリゴ糖鎖リガンド固定化させ、次いで、図9(c)に示すようにさらに濃度を変えてvWFペプチドを注入した。このようにして得られたセンサグラムの一例を図10に示す。

【0166】図10はセンサチップ上にオリゴ糖鎖リガンドを固定化させ、濃度を変えてvWFペプチドを注入したときのSPRのセンサグラムの結果の一例であり、横軸はランニングバッファのフロー時間を示し、縦軸は共鳴角度変化(RU)を示す。

【0167】また、図10中、↑はオリゴ糖鎖リガンドの注入を示し、↓は結合に関与しなかったオリゴ糖鎖リガンドの洗浄のためのランニングバッファの注入を示す。オリゴ糖鎖リガンドは、その濃度を1.39 μ Mから2.22 μ Mまで連続的に変化させて上記センサチップに加えた。なお、ランニングバッファにはpH7.4

のPBSを使用し、その流量は10 μ l/minとした。また、表面プラズモン共鳴装置には、日本レーザー電子社製の表面プラズモン共鳴装置「SPR670」を用いた。オリゴ糖鎖リガンドの固定化量は、オリゴ糖鎖リガンドの注入前のベースラインと、余分なオリゴ糖鎖リガンドが洗い流され、共鳴角度変化(RU)が一定になった時の差が固定化量に相当する。上記のセンサグラムではオリゴ糖鎖リガンドの固定化量は140 RUであった。

【0168】続いて、オリゴ糖鎖リガンドを固定化させたセンサチップに、vWFペプチドを注入し、結合させた後、ランニングバッファにより解離させ、その時の共鳴角度変化(RU)を観測した。vWFペプチドは、その濃度を0.5 μ Mから1.0 μ Mまで連続的に変化させて上記センサチップに加えた。結合定数 K_D の算出には、オリゴ糖鎖リガンドとvWFペプチドとの結合による正の共鳴角度変化から求めた結合速度と、解離による負の共鳴角度変化から求めた解離速度とを用いた。

【0169】上記の測定から算出された結合定数 K_D は、Sobel等が放射標識法によって求めた値(M. Sobel et al., J. Biol. Chem. (1992), vol. 267, p8857、 $K_D = 370 \pm 100$ nM)とほぼ同じ値($K_D = 280$ nM)であった。

【0170】以上のように、本実施の形態においては、糖鎖を集合化させるための新規なビオチンリンカーを提供した。そして、このビオチンリンカーを用いることにより、糖鎖を集合化させることができた。そして、この集合化させた糖鎖と蛋白質との相互作用をSPRで確認することにより、ビオチンリンカーのSPRへの応用が可能であることが判った。

【0171】このように、上記ビオチンリンカーは、その分子内にビオチンが導入されていることで、既知の方法で前もってストレプトアビジンを固定化したチップやアフィニティークロマトグラフィーの担体に、ビオチン-アビジンの強い特異的相互作用を利用したビオチン-ストレプトアビジン結合によりオリゴ糖鎖を固定化することができる。

【0172】この結果、上記ビオチンリンカーを用いることで、還元末端を有しているオリゴ糖鎖を蛋白質分析用の支持体表面に簡便に固定化できるようになった。また、従来、不可能であった、自然界から単利精製して得られるオリゴ糖をそのまま用いて蛋白質分析用の支持体表面に固定することが可能となった。

【0173】

【発明の効果】以上のように、本発明によれば、分子内にS-S結合もしくはビオチンを持たせた部位をリンカー化合物に導入することで、自然界から単離、精製して得られる種々のオリゴ糖を一段階で、蛋白質分析用の支持体表面に固定化できると共に、このような支持体を用いて分析する蛋白質との疎水性相互作用に基

づく非特異的な相互作用による影響が低減された蛋白質分析用の支持体を得ることができるリンカー化合物およびリガンド並びにオリゴ糖鎖の固定化方法および蛋白質分析用の支持体を提供することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】一般式(4)で表される本発明のリガンドを用いて硫酸化多糖へパリン中の部分二糖構造を固定化してなる蛋白質分析用の支持体を示す模式図である。

【図2】従来のリガンドを用いてマルトースをセンサチップに結合させた場合における非特異的な相互作用によるレスポンスと一般式(3)で表される本発明のリガンドを用いてグルコースを蛋白質分析用の支持体に結合させた場合における非特異的な相互作用によるレスポンスとを比較するグラフである。

【図3】図1に示す蛋白質分析用の支持体を用いてBSA並びに合成vWFペプチドとの非特異的な相互作用によるレスポンスを測定した結果を示すグラフである。

【図4】合成vWFペプチドの濃度を連続的に変化させて図1に示す蛋白質分析用の支持体に加えた場合の結合曲線を示すグラフである。

【図5】合成vWFペプチドの濃度を連続的に変化させて図1に示す蛋白質分析用の支持体に加えた場合における合成vWFペプチドの上記蛋白質分析用の支持体への固定化量の変化を示すグラフである。

【図6】一般式(5)で表される本発明のリガンドを用いてオリゴ糖鎖を集合可能なうえ固定化してなる蛋白質

分析用の支持体を示す模式図である。

【図7】(a)～(d)は、一般式(5)で表される本発明のリガンドを上記蛋白質分析用の支持体上に固定化する操作を示す説明図である。

【図8】SPRに用いる蛋白質分析用の支持体上にストレプトアビジンを固定化した時のSPRのセンサグラムである。

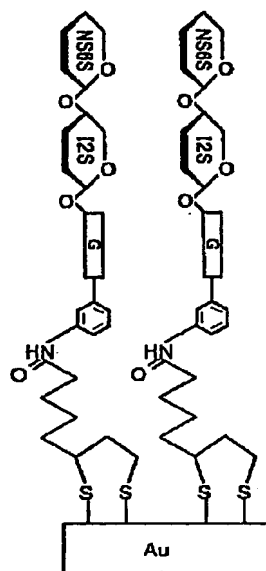
【図9】(a)は、ストレプトアビジンを固定化したSPR用の蛋白質分析用の支持体を示す模式図であり、(b)は、(a)に示す蛋白質分析用の支持体に一般式(5)で表される本発明のリガンドを固定化させた状態を示す模式図であり、(c)は、(b)に示す蛋白質分析用の支持体にさらに濃度を変えてvWFペプチドを注入したときの上記蛋白質分析用の支持体とvWFペプチドとの相互作用を示す模式図である。

【図10】SPRに用いる蛋白質分析用の支持体上に一般式(5)で表されるリガンドを固定化させ、濃度を変えてvWFペプチドを注入したときのSPRのセンサグラムである。

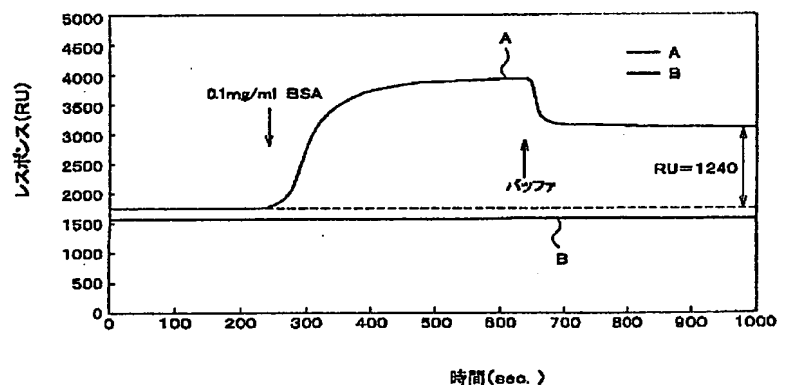
【図11】従来のリガンドを用いて疎水性相互作用により硫酸化多糖へパリン中の部分二糖構造を固定化してなる従来のセンサチップを示す模式図である。

【図12】図11に示すセンサチップを用いて硫酸化多糖へパリン中の部分二糖構造と硫酸化多糖へパリン結合性の蛋白質との結合挙動を解析した結果を示すグラフである。

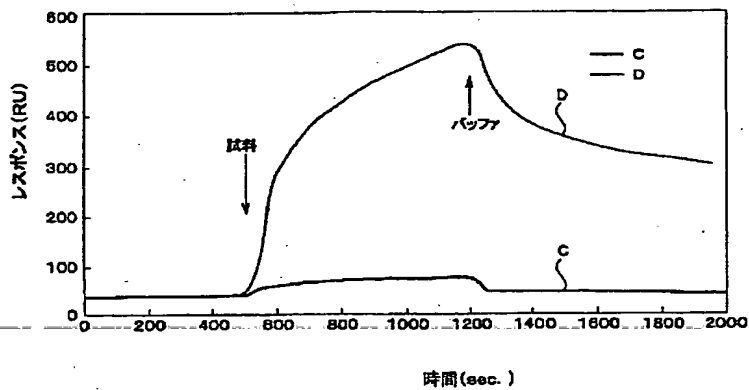
【図1】



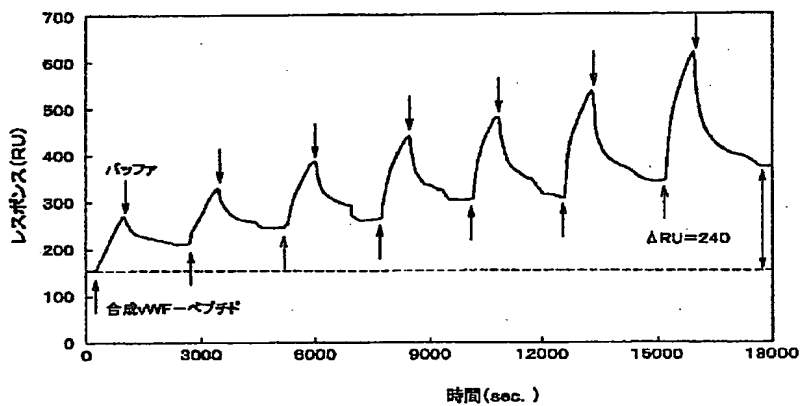
【図2】



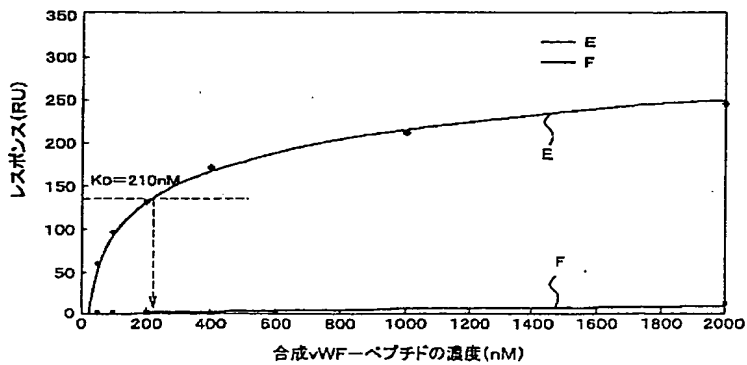
【図3】



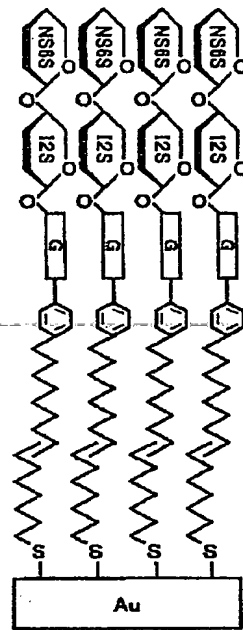
【図4】



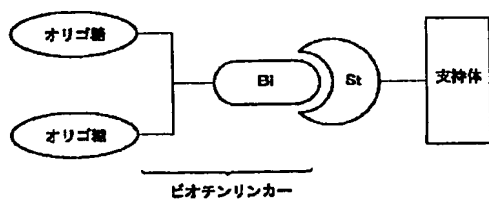
【图5】



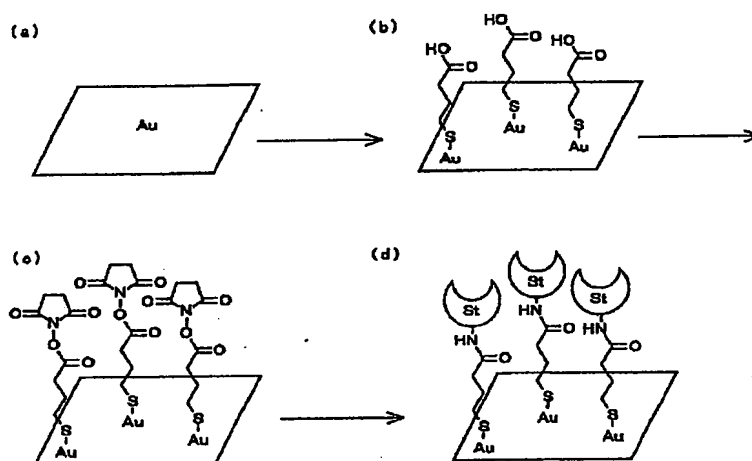
【図 1 1】



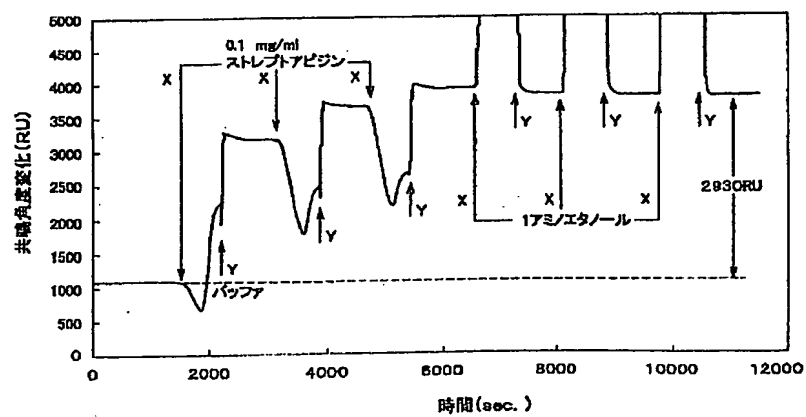
【図6】



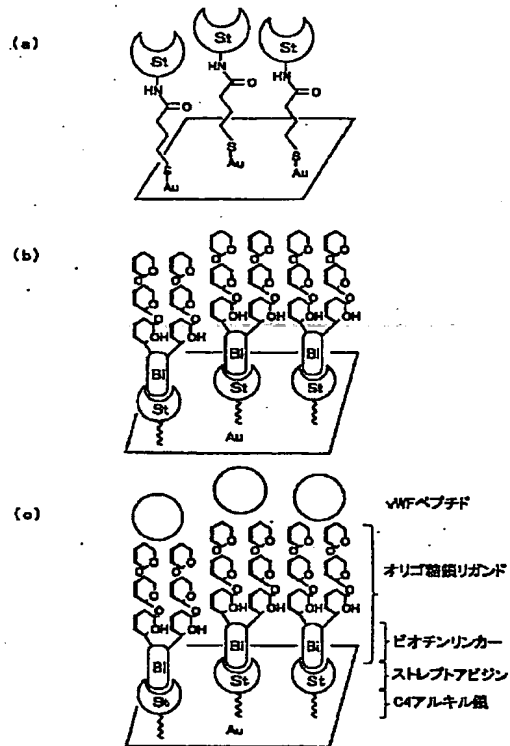
【図7】



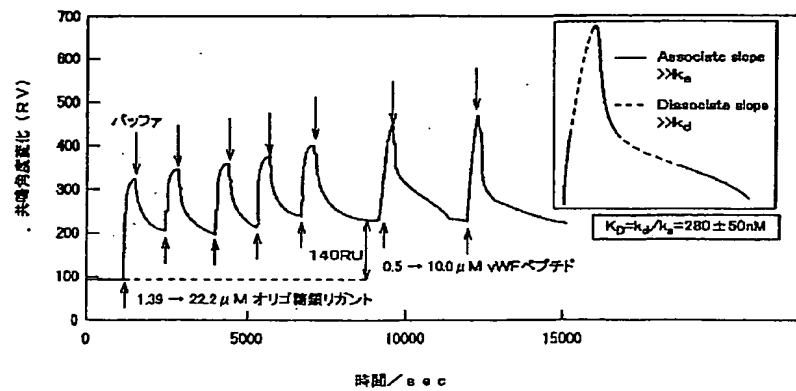
【図8】



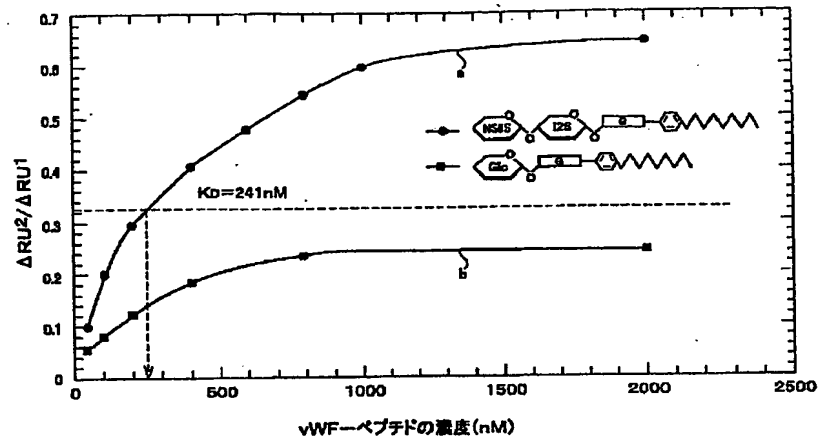
【図9】



【図10】



【図12】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/566

識別記号

F I

G 0 1 N 33/566

ターミナル (参考)

Fターム (参考) 4C057 CC03 DD01 JJ09

4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 EE13

FF04 GG06 HH08 JJ01 LL07

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)